

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL
NIK contribuye
a la lesión vascular

Ciro Baeza Bermejillo

Madrid, 2018

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**NIK CONTRIBUYE
A LA LESIÓN VASCULAR**

Memoria que presenta el licenciado en Medicina y Cirugía

Ciro Baeza Bermejillo

Para optar al grado de Doctor

Por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de tesis:

Dr. Alberto Ortiz Arduan

Dra. María Dolores Sánchez Niño

Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz

Universidad Autónoma de Madrid

La presente tesis doctoral ha sido dirigida por los doctores
Alberto Ortiz Arduan y María Dolores Sánchez Niño
y ha sido financiada por el Proyecto del Instituto de Salud Carlos III (FIS PI15/00298)

A mi familia.

A María.

A 2mm.

*“Siempre que conozcas a alguien,
regálale una sonrisa”.*

Mamá

AGRADECIMIENTOS

.....y por fin, escribo los agradecimientos.

Han pasado unos cuantos años desde que acudí al despacho del Dr. Ortiz con la firme intención de doctorarme en Medicina, y durante este tiempo han ocurrido muchas cosas: he pasado de ser residente de Cirugía Vascular a médico adjunto; he tenido dos jefes de servicio distintos; dos directores de tesis diferentes; he compartido vivencia con más de 10 compañeros de residencia; he tenido 3 domicilios diferentes; ahora vivo en otra ciudad; han nacido 4 sobrinos; mis padres y hermana me han animado para no desesperarme con este proyecto en más de un millón de ocasiones; he cambiado de trabajo; he atravesado el Océano Atlántico en velero (parte de este trabajo ha sido redactado en ese viaje); he conocido a la persona por la que lo dejaría todo; he disfrutado cuando el Atleti ganó la Liga, la Copa del Rey y tres Europa League; he llorado de la forma más amarga cuando perdimos las finales de Lisboa y Milán; y, lo más importante, ¡¡¡voy a ser padre en unos meses!!!

Quería expresar mi agradecimiento a todos aquellos que me habéis ayudado de alguna manera a llegar al final de este largo camino. Al Dr. Alberto Ortiz y a la Dra. M^a Dolores Sánchez-Niño, gracias por regalarme esta historia y dejar que yo la cuente (te cojo prestada la frase Loli); a Susana (mano a mano desde el principio) y al resto del personal del laboratorio de “Nefro” y del animalario de la FJD (han sido horas y horas..); y, por último, quería manifestar mi más sincero respeto a todos los roedores que, de forma tan escasamente reconocida, han contribuido a que este estudio se pudiera llevar a cabo.

Gracias a todos

RESUMEN

La hiperplasia intimal es la respuesta universal de los vasos sanguíneos a un proceso de agresión vascular, consistente en el engrosamiento de la túnica íntima, que puede conducir a la obstrucción de la luz del vaso, lo que supone una de las causas más importantes de fracaso de los injertos vasculares. El factor de transcripción NF- κ B es un complejo proteico implicado en la respuesta celular inflamatoria, que regula la expresión de diferentes quimioquinas que promueven el reclutamiento de células del sistema inmunitario en el lugar donde se ha producido la lesión. Por otra parte, la vitamina D y sus derivados, tienen un efecto directo sobre la expresión de genes que regulan la diferenciación y la proliferación celular en la pared vascular, y se ha demostrado que existe una asociación epidemiológica entre el déficit de vitamina D y la enfermedad cardiovascular. Se ha postulado que la acción inmunomoduladora de la vitamina D ocurriría a través de la regulación de citoquinas proinflamatorias y de la señalización del NF- κ B. Sin embargo, en el contexto de la enfermedad arterial periférica, los mecanismos moleculares que limitan la inflamación no son todavía bien conocidos. En este sentido, hipotetizamos que el conocimiento de los factores que regulan el daño vascular, puede permitir el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos. En concreto nos centramos en el estudio de factores modulados por paricalcitol, un análogo sintético de la vitamina D.

El primer objetivo fue estudiar el impacto de paricalcitol en el desarrollo de hiperplasia intimal in vivo en un modelo de daño endotelial sobre femoral de rata. El estudio morfométrico demostró una disminución del porcentaje de estenosis arterial en el grupo de ratas tratadas con paricalcitol. Asimismo, paricalcitol disminuyó la expresión génica de una serie de factores implicados en el daño vascular, entre ellos NIK, una quinasa proinflamatoria que regula la vía de activación no canónica de NF- κ B. El siguiente paso fue caracterizar el papel de la enzima NIK en la lesión endotelial, realizando el mismo modelo de daño vascular en ratones con actividad deficiente para dicha enzima. Estos ratones mostraron una disminución significativa en el porcentaje de estenosis arterial así como en la expresión de quimioquinas, identificando un papel clave de NIK en la lesión vascular. La información obtenida en esta tesis servirá en el futuro para diseñar aproximaciones terapéuticas que puedan proteger frente a la hiperplasia intimal secundaria al daño arterial.

ABSTRACT

Intimal hyperplasia is the universal response of blood vessels in a process of vascular aggression, consisting of thickening of the tunica intima. This thickening can lead to obstruction of the lumen of the vessel, which is one of the most important causes of a failure of the vascular injections. The transcription factor NF- κ B is a protein component involved in the inflammatory cell response, which regulates the expression of different chemokines that promote the recruitment of cells of the immune system in the place where the injury has occurred. On the other hand, vitamin D and its derivatives have a direct effect on the expression of genes that regulate the differentiation and cell proliferation in the vascular wall, and it has been shown that there is an epidemiological association between vitamin D deficiency and cardiovascular disease. The immunomodulatory action of vitamin D occurs through the regulation of proinflammatory cytokines and NF- κ B signaling. However, in the context of peripheral arterial disease, the molecular mechanisms that limit inflammation are not yet well known. In this sense, we hypothesize that knowledge of the factors that regulate vascular damage may allow the development of new therapeutic approaches. In particular, we focus on the study of factors modulated by paricalcitol, a synthetic analogue of vitamin D.

The first objective was to study the impact of cerebral palsy on the development of intimal hyperplasia in vivo in a rat femoral endothelial damage model. The morphometric study showed a decrease in the percentage of arterial stenosis in the group of rats treated with paricalcitol. It was also affected by the decrease in gene expression of a number of factors involved in vascular damage, including NIK, a proinflammatory kinase that regulates the non-canonical activation pathway of NF- κ B. The next step was to characterize the role of the enzyme. NIK in the endothelial lesion, performing the same model of vascular damage in mice with deficient activity for said enzyme. These mice have a significant decrease in the percentage of arterial stenoses as well as chemokine expression, suggesting a role of NIK in vascular injury.

The information obtained in the studies of this test will serve in the future to design therapeutic approaches that eventually preserve and protect against intimal hyperplasia secondary to arterial damage.

ÍNDICE

Relación de abreviaturas.....	5
I. INTRODUCCIÓN	7
1. La enfermedad cardiovascular (ECV).....	9
2. Hiperplasia intimal	9
2.1. Inflamación en la Hiperplasia Intimal.....	12
2.2. Macrófagos y linfocitos T	13
3. El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B	
activadas: NF-κB	13
3.1. Activación canónica y no canónica de NF- κ B: NIK.....	14
3.2. Citoquinas y sus receptores	17
3.3. Quimioquinas	19
3.4. Factores de crecimiento	22
4. Vitamina D.....	22
4.1. Origen y metabolismo: 25 hidroxivitamina D y calcitriol	22
4.2. Asociación epidemiológica con el daño cardiovascular	25
4.3. VDR y paricalcitol	26
4.4. Metabolismo calcio/fósforo	28
4.5. Efecto antiinflamatorio	29
II. HIPÓTESIS.....	31
III. OBJETIVOS.....	35
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Diseño general del abordaje experimental	41
2. Modelos experimentales	42
2.1. Modelos de daño endotelial en rata.....	43
2.2. Modelo de daño endotelial en ratón	46
3. Estudio Histológico y Morfométrico	47
3.1. Histología	47
3.2. Histomorfometría	48
4. Estudio de proteínas	48
4.1. ELISA	49
4.2. Inmunohistoquímica.....	49
5. Estudios de expresión de mRNA: transcripción inversa y PCR a tiempo real.....	50
6. Análisis estadístico de los datos	50

V. RESULTADOS	53
1. Daño endotelial en rata: impacto del paricalcitol y mecanismos moleculares implicados.....	55
1.1. El paricalcitol tiende a disminuir la hiperplasia intimal y la estenosis secundaria a la lesión endotelial.....	55
1.2. Potenciales mediadores del daño intimal en ratas.....	61
1.3. Resumen del daño endotelial en ratas	68
2. Daño endotelial en ratón: La quinasa NIK promueve la estenosis arterial causada por la lesión endotelial.....	69
2.1. La deficiencia de NIK protegió de la estenosis arterial	69
2.2. Expresión génica en la lesión arterial del ratón: impacto de la deficiencia de NIK	75
2.3. En los ratones NIK ^{aly/aly} está disminuida la inflamación secundaria al daño endotelial.	78
2.4. Conclusión del modelo de ratón.....	78
VI. DISCUSIÓN	81
1. Modelo Experimental	83
2. Expresión local de potenciales mediadores del daño vascular	86
3. NIK y el daño vascular	88
4. VDR y el daño vascular	90
5. NIK como diana terapéutica.....	95
VII. CONCLUSIONES	99
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	103

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos, se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza con un factor
Aly	Alymphoplasia
APES	Aminopropyl triethoxysilane
BAFF	B-cell activating factor
CD43; CD74	Cúmulo de diferenciación (Cluster of differentiation en inglés)
DDT	D-dopachrome tautomerase
EAP	Enfermedad arterial periférica
ECV	Enfermedad cardiovascular
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GDF15	Growth differentiation factor 15
Fn14	Factor inducible por factores de crecimiento de fibroblastos-14
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IH	Inmunohistoquímica
IKK	I κ B Kinasa
I κ B	Inhibidor de κ B
IL	Interleucina
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
INF	Interferón
LBD	Dominio de unión a ligando
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAP 3K14	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 14
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MIF	Macrophage migration inhibitory factor

MMP	Metaloproteinasas
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas
NIK	Nuclear factor κ B-inducing kinase
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMN	Polimorfonuclear
PTH	Hormona paratiroidea
RANKL	Ligando de receptor activador del factor nuclear κ B
RANTES	Regulated on Activation, normal T cell expressed and secreted
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta 1
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF	TNF receptor associated factor
TWEAK	Inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral
VCAM	Molécula de adhesión a células vasculares
VDR	Receptor de vitamina D
WT	Wild type (cepa salvaje, no mutada)

I. INTRODUCCIÓN

*“Y si he escrito esta carta tan larga,
ha sido porque no he tenido tiempo
de hacerla más corta”*

Blaise Pascal

1. La enfermedad cardiovascular (ECV)

La ECV constituye la primera causa de muerte en la población española, originando en torno a 115.000 muertes anuales, lo que supone el 30% de todas las defunciones ¹.

La enfermedad arterial periférica (EAP) es la tercera causa de morbilidad cardiovascular después de la enfermedad coronaria y el accidente cerebrovascular. En la primera década del siglo XXI, la población de pacientes con EAP aumentó en un 23.5% de 164 millones en el año 2000 a 202 millones en el año 2010, y más de dos tercios de esta población se concentraba en países en vías de desarrollo ².

Existen numerosos procedimientos de revascularización de los miembros inferiores, ya sean técnicas quirúrgicas convencionales como técnicas endovasculares ³. Los resultados en cuanto a permeabilidad de la revascularización dependen tanto de la extensión de la obstrucción arterial como de la comorbilidad del paciente y del tipo de procedimiento realizado. Asimismo, las tasas de permeabilidad dependen del sector revascularizado y del tipo de injerto empleado, pudiendo variar desde un 75% a los 5 años en un *bypass* derivado a la arteria poplítea empleando vena safena interna, hasta un 12% a los 5 años en caso de revascularizaciones infrapoplíteas con material protésico ⁴⁻⁶. Asimismo, el éxito y la duración de una angioplastia transluminal queda limitado por el desarrollo de la reestenosis proliferativa inherente a dichos procedimientos, con tasas de permeabilidad aún más variables en función de cada sector y del tipo de procedimiento.

La principal causa de esta reestenosis es el desarrollo de hiperplasia intimal, un proceso biológico dependiente de células inflamatorias en la pared del injerto que se produce en el periodo postoperatorio que abarca, con mayor frecuencia, de los 2 meses a los 2 años y que supone la causa más común del fracaso de los injertos cardiovasculares a medio plazo ⁷.

2. Hiperplasia intimal

La *hiperplasia intimal* es una respuesta biológica que se produce en los vasos sanguíneos ante una lesión y consiste en un cambio estructural crónico en arterias denudadas de endotelio, en las venas arterializadas y en injertos de derivación protésicos. Las arterias se reparan mediante una proliferación celular que conduce a la aparición de nuevos

estratos celulares en la capa íntima. Las lesiones vasculares estimulan el crecimiento de las células musculares lisas, que “tapizan” el área denudada de la arteria y conducen a la formación de una neointima. Este proceso se realiza mediante una serie de pasos (**Error!**

Reference source not found.):

- 1) migración de células musculares lisas desde la media a la íntima;
- 2) proliferación de las células en la íntima,
- 3) síntesis y depósito de matriz extracelular y
- 4) regeneración endotelial.

Durante el proceso curativo, las células musculares lisas sufren cambios similares a los de la desdiferenciación. Las células musculares que emigran desde la media a la íntima, pierden su poder contráctil, aumentan su capacidad para multiplicarse y comienzan a sintetizar matriz extracelular, lo que supone un cambio de fenotipo contráctil a un fenotipo proliferativo-sintético. En condiciones normales, es raro observar la multiplicación de una célula muscular lisa de la pared arterial, mientras que un 15-40% aproximadamente de esas células, presentan mitosis en las 48 horas posteriores a una lesión arterial experimental ⁸.

Las causas de la lesión endotelial pueden ser: quirúrgicas, por procedimientos de revascularización; metabólicas, como la diabetes; infecciosas, tanto víricas como bacterianas; e inmunes, como las vasculitis. Asimismo, cabría tener en cuenta causas fisiológicas como el envejecimiento.

Por lo tanto, la hiperplasia intimal puede considerarse, en definitiva, como un proceso cicatricial en respuesta a un daño o una agresión del endotelio, cuya reparación consiste en la formación de una nueva capa celular en la luz del vaso afectado. Como es obvio, esta nueva capa asume un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la pared vascular, sin embargo, el crecimiento proliferativo al que se ve sometido debe regularse de alguna forma, ya que ocasionalmente podría descontrolarse y producir una respuesta exagerada que conduciría de forma inexorable a la estenosis o incluso la oclusión del vaso sanguíneo.

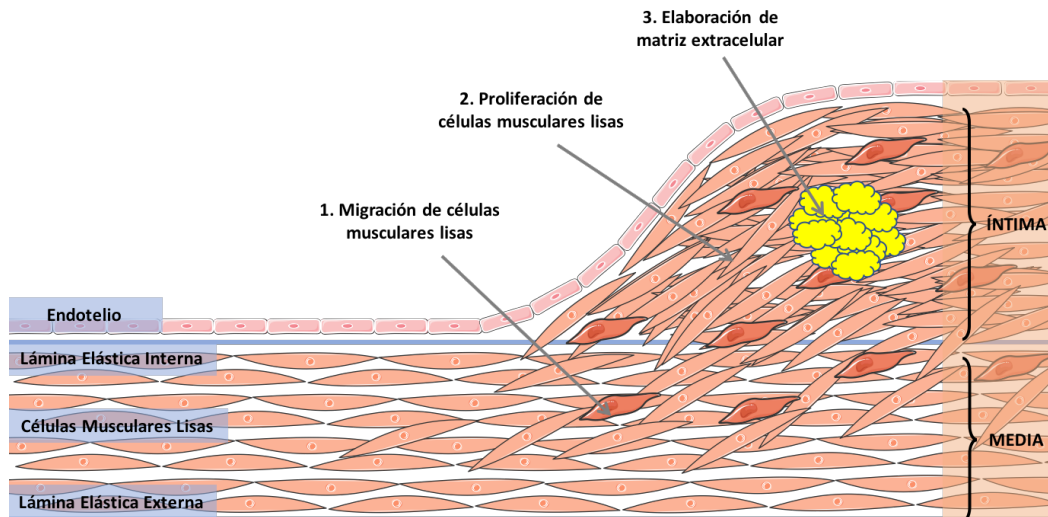


Figura 1. Diagrama esquemático del engrosamiento intimal. Se representa la migración y proliferación de células del músculo liso y la síntesis de la matriz extracelular. Las células musculares de la íntima, pueden migrar directamente de las capas subyacentes o pueden ser reclutadas a partir de precursores en la circulación; se representan en un color diferente del de las células del músculo liso medial, para enfatizar su fenotipo distinto.

Como hemos señalado, la etiopatogenia de la hiperplasia intimal sería superponible a la del proceso de cicatrización, con una fase hemostática, una inflamatoria y una proliferativa.

El conocimiento y el estudio del control y desarrollo de la hiperplasia intimal ha sido suponen un objetivo primordial para la clínica y para la investigación vascular. Se han diseñado diferentes protocolos para inhibir algunos de los pasos implicados en el desarrollo de la hiperplasia, actuando sobre diferentes moduladores: TGF- β 1, agentes reguladores de la agregación plaquetaria, corticoides, angiotensina II, flujos intracelulares de calcio, factores de transcripción nucleares, óxido nítrico y otros⁹. Sin embargo, todavía no existe una solución plenamente satisfactoria.

También cabe mencionar brevemente la implicación de la modulación no farmacológica. Se ha demostrado la importancia del ejercicio físico sobre el desarrollo de la lesión arterial¹⁰, así como la implicación de fuerzas hemodinámicas, habiéndose comprobado que la distensión de las células musculares lisas permite la activación de tirosin quinastas que facilitan la proliferación de las mismas células musculares lisas¹¹. Actualmente, se están desarrollando stents con disposición helicoidal de su línea central que mejoran estas

fuerzas hemodinámicas sobre la pared arterial y disminuyen el desarrollo de hiperplasia intimal ¹².

Se han discutido varios orígenes de las células de músculo liso activadas, que incluyen media, adventicia y células precursoras de médula ósea ^{13,14}. Muchos estudios han analizado los mecanismos moleculares y celulares de la hiperplasia intimal y se han realizado numerosos intentos para definir estrategias farmacológicas para mitigar su desarrollo en respuesta a los injertos de derivación ¹⁵. El uso de stents y balones liberadores de droga ya se ha establecido como tratamiento efectivo en las angioplastias desde hace décadas. La liberación de fármacos inmunosupresores como sirolimus, everolimus o inhibidores de mitosis como el paclitaxel, reducen la hiperplasia intimal, aunque exponen a una mayor probabilidad de trombosis intrastent, por lo que se requiere combinar con tratamientos prolongados de antiagregantes como clopidogrel. Estas terapias no son aplicables en la derivación vascular con injertos, por lo que se han desarrollado técnicas para la modulación de la expresión génica de la remodelación vascular en estos procedimientos. En el estudio PREVENT III se concluía que el silenciamiento génico no-viral en los bypass de vena era factible y seguro ¹⁶. Hay estudios que revelan que la expresión de miles de genes en las células endoteliales y en las células del músculo liso vascular de los injertos venosos en perros se ven alterados en las primeras 24h del implante y que volvían a su expresión basal a las 4 semanas ¹⁷. Actualmente se están desarrollando terapias con “small interfering RNA” (siRNA) para silenciar la expresión de estos genes ¹⁸.

2.1. Inflamación en la Hiperplasia Intimal

Cualquier proceso cicatricial presenta una primera fase hemostática en la que se desarrolla el coagulo y tapón plaquetari seguido de una fase inflamatoria y por último una fase proliferativa.

Tras la denudación endotelial, se produce una potente respuesta inflamatoria con adherencia de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y monocitos de la superficie endotelial o denudada. El mecanismo exacto de esta respuesta no está determinado. Si se compara con el endotelio no lesionado, el endotelio que regenera muestra un mayor grado de expresión de la molécula de adhesión de las células vasculares (VCAM) y de la

molécula de adhesión intercelular (ICAM) ¹⁹, que facilitan la adhesión de leucocitos, y pierde propiedades antitrombóticas.

2.2. Macrófagos y linfocitos T

En la fase inflamatoria, los monocitos y linfocitos, que desempeñan un papel importante en las áreas de lesión donde hay disminución y alteración del flujo, se activan para iniciar un proceso mediado por moléculas de adhesión y selectinas; posteriormente se activa un proceso de adhesión más fuerte, mediado por integrinas, y los leucocitos llegan a penetrar en el interior de la pared vascular.

Los leucocitos que migran a la pared vascular durante el proceso inflamatorio, contribuyen al proceso hiperplásico liberando estímulos proinflamatorios y estímulos que favorecen el proceso de mitosis celular contribuyendo así al cambio fenotípico de las células musculares lisas migradas. Por otra parte, remodelan la matriz extracelular generada por medio de la liberación de enzimas.

Los polimorfonucleares liberan radicales libres de oxígeno, serinproteasas y metaloproteinasas (MMP), implicadas en fenómenos de migración celular. Las células T activadas producen citoquinas proinflamatorias como la IL-2 o INF-gamma, MMP y factores de crecimiento como PDGF, directamente implicados en el proceso de hiperplasia intimal. Los macrófagos elaboran y liberan multitud de factores de crecimiento y citoquinas, así como radicales de oxígeno y lípidos bioactivos, como los metabolitos del ácido araquidónico ²⁰.

3. El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas: NF-κB

En la fase proliferativa, caracterizada por la proliferación y migración de células musculares lisas, se han identificado factores de transcripción como el NF-κB y varios proto-oncogenes, que controlan de forma positiva el crecimiento de las células musculares lisas y la respuesta inflamatoria y fibrogénica a través de la regulación de interleuquinas y otras citoquinas.

NF- κ B es un complejo proteico que controla la transcripción de más de un enorme número de genes del ADN y está implicado en la respuesta celular frente a determinados estímulos.

La familia NF- κ B en mamíferos tiene cinco miembros, RelA/p65, RelB, c-Rel, NF- κ B1/p50 y NF- κ B2/p52²¹. Estos miembros se combinan como homo o heterodímeros para llevar a cabo la transcripción de ADN. Las proteínas NF- κ B1 y NF- κ B2 son sintetizadas como precursores, p105 y p100, que tras madurar por proteólisis dan lugar a las subunidades de NF- κ B, p50 y p52 respectivamente²². NF- κ B1 y NF- κ B2 son las subunidades encargadas de llevar a cabo la transcripción genética, mientras que RelA, RelB y C-Rel simplemente son componentes que ayudan a configurar la estructura dimérica. La formación de p52 a partir de p100 es un proceso regulado a través de la denominada vía no canónica de activación de NF- κ B mediante una serie de enzimas entre las que destaca NIK (MAP3K14) como la principal protagonista.

3.1. Activación canónica y no canónica de NF- κ B: NIK

La forma de activación clásica o vía canónica, comienza con el NF- κ B inactivo en el citosol formando un complejo con la proteína inhibitoria I κ B. Las I κ Bs, enmascaran la secuencia de localización nuclear (NLS) del NF- κ B manteniéndolo en estado de inactivación en el citoplasma. A través de receptores integrales de membrana, una variedad de señales extracelulares activa la enzima quinasa de I κ B (IKK). La IKK está formada por las subunidades catalíticas IKK α , IKK β e IKK γ o NEMO (modulador esencial de NF- κ B). Cuando es activada por señales extracelulares, IKK fosforila los residuos de serina de I κ B que mantienen inhibido a NF- κ B. La fosforilación conlleva la ubiquitinización de I κ B, y su posterior degradación en el proteasoma, lográndose la disociación definitiva del complejo I κ B-NF- κ B. Al disociarse NF- κ B de su inhibidor, queda activada y puede entrar en el núcleo, donde se une a secuencias específicas llamadas elementos de respuesta κ B, dando lugar a la expresión de genes que provocan un cambio en la función de la célula y que desencadenarán la respuesta inflamatoria correspondiente (Figura 2). Además, NF- κ B activa la expresión de su propio represor, I κ B α , por lo que se genera un mecanismo de feedback negativo que regula el proceso.

Uno de los aspectos que resulta ciertamente interesante del factor de transcripción NF- κ B es, por lo tanto, su capacidad de dar una respuesta celular de rápida acción, ya que, al estar presente de forma constitutiva en el interior de la célula en un estado de inactivación, no requiere de una síntesis proteica de novo. Esto permite a NF- κ B ser la primera respuesta a estímulos celulares nocivos. Los inductores de la actividad NF- κ B son muy variables y pueden ser desde especies reactivas de oxígeno (ROS) hasta citoquinas como factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), lipopolisacáridos, y otros^{23–25}.

Como hemos indicado, la activación del NF- κ B en respuesta a señales extracelulares puede proceder a través de las vías clásica/canónica, ya descrita, pero además existe otra alternativa de activación como es la vía alternativa/no canónica^{26–28}. La activación clásica de NF- κ B es una respuesta rápida y transitoria a una amplia gama de estímulos, mientras que la vía alternativa implica la activación lenta del heterodímero p100/RelB que conduce a la generación de p52/RelB y la activación prolongada de los genes diana NF- κ B en respuesta a un conjunto más limitado de estímulos²⁹.

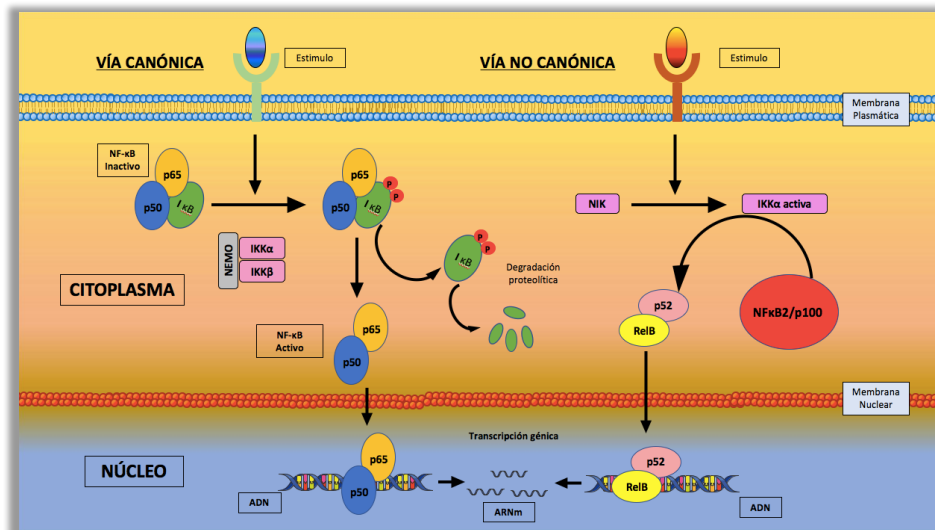


Figura 2. Vías de Activación del NF κ B. En la activación canónica, I κ B se degrada a través de la activación de IKK permitiendo al dímero RelA/p50 migrar al núcleo y unirse al ADN. En la vía no canónica, NIK activa a IKK α , lo que permite el procesamiento de p100 a p52, formando el dímero RelB/p52 que migra al núcleo para unirse al ADN.

Son solo un grupo específico de estímulos inflamatorios y de diferenciación celular, como linfotoxina- β , BAFF, TWEAK o RANKL ²⁶, los capaces de activar la vía no canónica de NF- κ B para inducir la generación del dímero RelB:p52. En esta vía, la interacción citoquina-receptor produce la activación de la quinasa inductora de NF- κ B (NIK, MAP3K14) que activa IKK α , conduciendo a la fosforilación y el posterior procesamiento proteasomal de la proteína precursora NF- κ B2/p100 a la subunidad activa p52. NIK (MAP3K14) pertenece a la familia de las MAP quinasas, que son proteínas quinasas que regulan efectos biológicos como la proliferación, diferenciación celular, hipertrofia, inflamación y transcripción de genes. La actividad excesiva de NIK está implicada en una serie de patologías como trastornos autoinmunes y cánceres ³⁰.

Una vez constituido el dímero p52/RelB puede migrar al núcleo, dónde tiene actividad de unión al ADN para regular la transcripción de dianas compartidas con NF- κ B clásico y también de genes específicos.

Teniendo en cuenta las diferentes regulaciones, se pensaba que ambas vías, canónica y no-canónica eran independientes la una de la otra. No obstante, se ha señalado que la síntesis de los constituyentes de la vía no-canónica, es decir RelB y p52, está controlada por la señalización canónica de IKK β -I κ B-RelA:p50 ³¹. Esto hace pensar que, en realidad, las vías de activación de NF- κ B forman parte de un sistema integrado que conduce a la activación de los dímeros RelA y RelB y que un mal funcionamiento de una de las vías puede dar lugar a una respuesta celular aberrante a través de la otra vía ³².

El NF- κ B es utilizado por las células como regulador de la expresión de genes que controlan la proliferación y la supervivencia celular. Regula principalmente genes anti-apoptóticos (TRAF1, TRAF2) ³³ que controlan la actividad de las caspasas, que son fundamentales en los procesos apoptóticos. Además NF- κ B regula la expresión de genes involucrados en la regulación de la inflamación, por lo que se encuentra activado crónicamente en enfermedades inflamatorias como la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis, la sepsis, el asma o la aterosclerosis ³⁴.

En general, no existe una clara especificidad de los dímeros NF- κ B y los genes que regulan. Sin embargo, los heterodímeros RelB/p52 activan una clase específica de genes que codifican ciertas quimioquinas y cuyos promotores contienen sitios κ B que divergen significativamente de los clásicos sitios κ B ³⁵.

Los perfiles moleculares de los genes transcritos varían en función del grado de activación temporal del NF- κ B³⁶. Hay un grupo de genes tempranos cuya transcripción está garantizada por estímulos cortos de NF- κ B, independientemente de la concentración de estímulo. Estos incluyen, por ejemplo, reguladores negativos de la actividad de NF- κ B (que proporcionan una retroalimentación negativa para NF κ B) y citoquinas o quimioquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, MCP-1 e IP10). A su vez, hay genes tardíos que se transcriben sólo cuando la activación de NF κ B dura al menos 1 hora. Estos genes dan lugar a receptores de superficie celular, moléculas de adhesión y adaptadores de señales, y algunas quimioquinas tales como RANTES/CCL5.

NF κ B también puede funcionar como un represor de la expresión génica a través de diversos mecanismos: complejos inactivos, competiciones de la subunidad RelA con co-activadores de la transcripción, modificaciones postraduccionales de RelA que regulan su función como activador o represor de la expresión génica y modificación postraduccionales de las histonas que rodean los genes diana de NF κ B³⁷.

En definitiva, NF- κ B es un factor de transcripción con un papel central en procesos inflamatorios mediante la regulación de la expresión de numerosas citoquinas y quimiocinas, receptores de superficie celular y moléculas de adhesión entre otros. Dado que NF- κ B es tan relevante, supone un objetivo de interés para la industria farmacéutica, y es importante caracterizar y conocer las vías de señalización accesorias de sus diferentes isoformas que imparten especificidad a su respuesta.

3.2. Citoquinas y sus receptores

Las citoquinas son proteínas solubles pequeñas producidas y secretadas de forma transitoria en respuesta a un estímulo. Las citoquinas se unen a receptores de superficie celular específicos generando cascadas de señalización que alteran el comportamiento o las propiedades de la propia célula o de otras células. Las citoquinas participan en la respuesta inmune innata, reacción inflamatoria, en la respuesta inmune específica o adquirida y en la hematopoyesis. Estas actividades se manifiestan en la activación, diferenciación y proliferación celular, en fenómenos de apoptosis y en su papel como factores quimiotácticos.

La inflamación es una respuesta fisiológica al daño, ya sea mecánico o infeccioso. Todos los procesos inflamatorios llevan consigo la activación de macrófagos residentes en los tejidos y órganos y la infiltración de leucocitos desde la sangre. La activación induce cambios en las células entre los cuales se incluyen la producción de citoquinas.

Existen múltiples citoquinas inflamatorias (IL-1 β y TNF- α , IFN- γ , IL-3, IL-8 o GM-CSF) que actúan activando receptores específicos ³⁸. IL-1 β y TNF- α , estimulan la producción celular de enzimas proteolíticas y radicales libres. Otras citoquinas actúan amplificando la respuesta inflamatoria estimulando la producción en macrófagos de nuevas citoquinas. Además, en las células endoteliales, inducen la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 y VCAM, que permiten la adherencia de células sanguíneas, y alteran la permeabilidad vascular permitiendo una extravasación de proteínas plasmáticas.

Por otra parte, el proceso inflamatorio se regula negativamente mediante la síntesis de otras citoquinas que serían antiinflamatorias, como TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1), IL-4 e IL-10, y que inhiben la producción de IL-1 β y TNF- α .

Igual de importante que las citoquinas, serían sus receptores, cuya abundancia en la membrana celular o su liberación al medio en forma soluble, comportándose como receptores señuelo, suponen un importante paso regulador de la actividad de citoquinas. Recientemente, la comunidad científica ha centrado su interés en el receptor de citoquinas CD74. Considerado tradicionalmente un componente invariable del sistema HLA, se ha identificado, entre otras funciones, como un receptor de membrana para la citoquina macrophage migration inhibitory factor (MIF) ³⁹, una de las primeras citoquinas conocidas y con un amplio rango de actividades inmunes y pro-inflamatorias ⁴⁰. MIF es producido por muchos tipos celulares del sistema inmune como linfocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos y además se produce en muchos órganos ⁴¹. Un amplio número de enfermedades humanas, incluyendo condiciones inflamatorias, tumores y desórdenes metabólicos como la aterosclerosis, presentan un aumento de las concentraciones de MIF en sangre periférica ^{42,43}. CD74 es también un receptor para la citoquina DDT (D-dopachrome tautomerase) ⁴⁴. La expresión de CD74 está aumentada en el daño a diversos órganos, incluidas enfermedades inflamatorias cardiovasculares como la aterosclerosis y nuestro grupo ha sido pionero en caracterizar su expresión y función en el daño vascular

y renal ⁴⁴⁻⁴⁸. Sin embargo, el papel preciso de CD74 en el daño endotelial y su relación con la vitamina D son mal conocidos.

3.3. Quimioquinas

Un conjunto particular de citoquinas corresponde a la familia de las quimioquinas. Las quimioquinas son un grupo de pequeñas proteínas básicas (8-14 kDa), estructuralmente relacionadas que fueron inicialmente descritas como moléculas inducidas por la inflamación y capaces de atraer monocitos, neutrófilos y linfocitos T activados ^{49,50}. Presentan una serie de características estructurales comunes, tales como su pequeño tamaño o la presencia de residuos de cisteína en regiones protegidas, que son clave para la construcción de su estructura tridimensional.

El papel más importante que desempeñan las quimioquinas es el de actuar como un quimioatrayente para guiar la migración celular. Las células siguen un gradiente de concentración hacia la fuente de la quimioquina. Además de intervenir directamente sobre la migración celular de leucocitos, monocitos y neutrófilos en los procesos inflamatorios, algunas quimioquinas promueven la angiogénesis, actuando sobre células endoteliales y otras están consideradas como homeostáticas, estando involucradas en el control de la migración de las células durante los procesos normales de mantenimiento o desarrollo de tejidos.

Se conocen más de 50 quimioquinas, que pueden clasificarse en 4 grupos dependiendo de la distancia entre sus dos primeros residuos de cisteína:

- Quimioquinas CC (o β -quimioquinas): tienen dos cisteínas adyacentes cerca de su extremo amino terminal. Se conocen al menos 27 miembros de este grupo, llamados quimioquina ligando (CCL) -1 a -28 ⁵¹. Las quimioquinas CC inducen la migración de monocitos y otros tipos celulares tales como células NK y células dendríticas. Como ejemplo de quimioquina CC encontramos la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2) que induce la atracción de monocitos desde el torrente sanguíneo para entrar en el tejido circundante y convertirse en macrófagos tisulares. MCP1 es la quimioquina mejor caracterizada desde el punto de vista de su función en la lesión tisular in vivo y existen ensayos

clínicos de moléculas pequeñas que inhiben MCP1 o su receptor y de anticuerpos neutralizantes anti-MCP1 con resultados muy prometedores en la nefropatía diabética ⁵². En este sentido, hemos elegido MCP1 como diana a estudiar en la presente tesis. Otros ejemplos de quimioquinas CCL son CCL5 (o RANTES) que atrae células que expresan el receptor CCR5, como por ejemplo las células T, eosinófilos y basófilos; y también las proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP-1 α o CCL3; MIP-1 β o CCL4).

- Quimioquinas CXC (o α -quimioquinas): las dos cisteínas N-terminales de CXC están separadas por un aminoácido, representado por la “X”. Se conocen 17 quimioquinas CXC. Inducen la migración de neutrófilos como por ejemplo la interleuquina-8 (IL-8) ⁵³, y de linfocitos.
- Quimioquinas C (o γ -quimioquinas): solo presentan dos cisteínas. Se han descrito dos quimioquinas de este grupo XCL1 y XCL2. Atraen a los precursores de las células T al timo.
- Quimioquinas CX₃C: presentan 3 aminoácidos entre las dos cisteínas. La única que se conoce es la CX₃CL1 o fractalquina. Puede, o bien secretarse, o bien mantenerse en la superficie de la célula que lo expresa, por lo que sirve tanto de quimioatrayente como de molécula de adhesión ⁵⁴. Se expresa en lesiones aterogénicas ⁴⁹. A diferencia de otras quimioquinas solubles, es una proteína transmembrana de tipo 1 que puede actuar como un receptor de adhesión celular eficiente que puede detener las células bajo condiciones de flujo sanguíneo fisiológico. Además, CX₃CL1 puede escindirse de la membrana de la célula para liberar una proteína soluble. En esta forma soluble, CX₃CL1 es un potente quimioatrayente para los monocitos, células T y células “natural killers” (NK). Por lo tanto, dependiendo de si existe como una proteína inmovilizada o una proteína soluble, CX₃CL1 puede funcionar como un receptor de adhesión celular o como un quimioatrayente.

Los receptores de las quimioquinas se encuentran en la superficie de los leucocitos y son receptores con siete dominios transmembrana que están acoplados a proteínas G.

Se han descubierto diecinueve receptores distintos que se dividen en 4 familias según la quimioquina a la que se unen, y se denominan con un número, según se han ido identificando y con la letra “R”, inicial de receptor (CXCR-1, CXCR-2, etc):

- CCR: se unen a quimioquinas CC
- CXCR: se unen a quimioquinas CXC
- CX3CR1: se unen a la única quimioquina CX3C (CX3CL1)
- XCR1: se une a las dos quimioquinas XC (XCL1 y XCL2)

Los receptores de quimioquinas tienen un tamaño similar, en torno a unos 350 aminoácidos. Tienen un extremo N terminal corto y ácido, siete dominios transmembrana helicoidales con tres bucles hidrofílicos extracelulares, y un extremo C terminal intracelular que contiene los residuos de serina y treonina, necesarios para la función como transmisor de señales intracelulares. Los primeros dos bucles de receptores de quimioquina extracelulares tienen cada uno un residuo de cisteína protegido que permite la formación de puentes disulfuro entre estos dos bucles. Las proteínas G se acoplan al C terminal de los receptores de quimioquina para permitir la señalización intracelular después de la activación del receptor, mientras el dominio N terminal del receptor de quimioquina determina la especificidad de unión del ligando ⁵⁵.

Los receptores de quimioquina se asocian con proteínas G para transmitir señales a la célula tras la unión del ligando. La activación de la proteína G desencadena una cascada de señalización, a través de la enzima fosfolipasa C (PLC), que desemboca en un aumento del calcio intracelular, hasta finalmente llevar a la actina a cambiar de forma, y generar el movimiento celular.

El número de receptores de quimioquinas es de entre 100 y 1000 por célula. Algunos receptores fijan diferentes quimioquinas mientras que otros son más selectivos. El hecho de que una quimioquina pueda acoplarse a más de un receptor no significa que los receptores sean redundantes, puesto que los procesos biológicos iniciados después del acoplamiento pueden ser muy diferentes.

3.4. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento también pueden contribuir al daño vascular. Aunque existen varias familias de factores de crecimiento, en esta tesis nos hemos centrado en uno de los factores más desconocidos, el factor de crecimiento y diferenciación 15 (GDF15), un miembro de la superfamilia de TGF- β 1⁵⁶. En concreto, GDF-15 se ha asociado a la patogenia del daño vascular^{57,58} y sus niveles en sangre se asocian a mal pronóstico en la enfermedad cardiovascular humana⁵⁹⁻⁶². Además se ha descrito que GDF15 está directamente regulado por NF κ B, suprimiendo la vigilancia inmunológica, y permitiendo el desarrollo de tumores⁶³. Sin embargo, se conoce mal su función específica durante el daño vascular, así como su relación con la vitamina D.

4. Vitamina D

La vitamina D o calciferol, es una vitamina liposoluble imprescindible para la formación de huesos y la absorción intestinal del calcio. La vitamina D puede obtenerse mediante la dieta (en forma de vitamina D2 o ergocalciferol) o por la transformación del colesterol (formando vitamina D3 o colecalciferol) por la exposición a rayos ultravioletas solares. En realidad, es una provitamina, ya que su forma original se transforma en el cuerpo por el propio metabolismo y factores exógenos para alcanzar su forma activa. Además de regular el metabolismo del calcio, tiene otra serie de funciones metabólicas que se desarrollan a través de la activación del receptor de la vitamina D (VDR)⁶⁴.

4.1. Origen y metabolismo: 25 hidroxivitamina D y calcitriol

La forma más abundante de vitamina D es la vitamina D3, o colecalciferol. No se trata realmente de una vitamina, puesto que no es necesario ingerirla en la dieta, ya que se obtiene mediante síntesis a partir del 7-dehidrocolesterol, un intermediario en la síntesis de colesterol. Es más exacto considerar a la vitamina D3 una prohormona, puesto que se convierte en un metabolito que actúa de manera análoga a una hormona esteroidea.

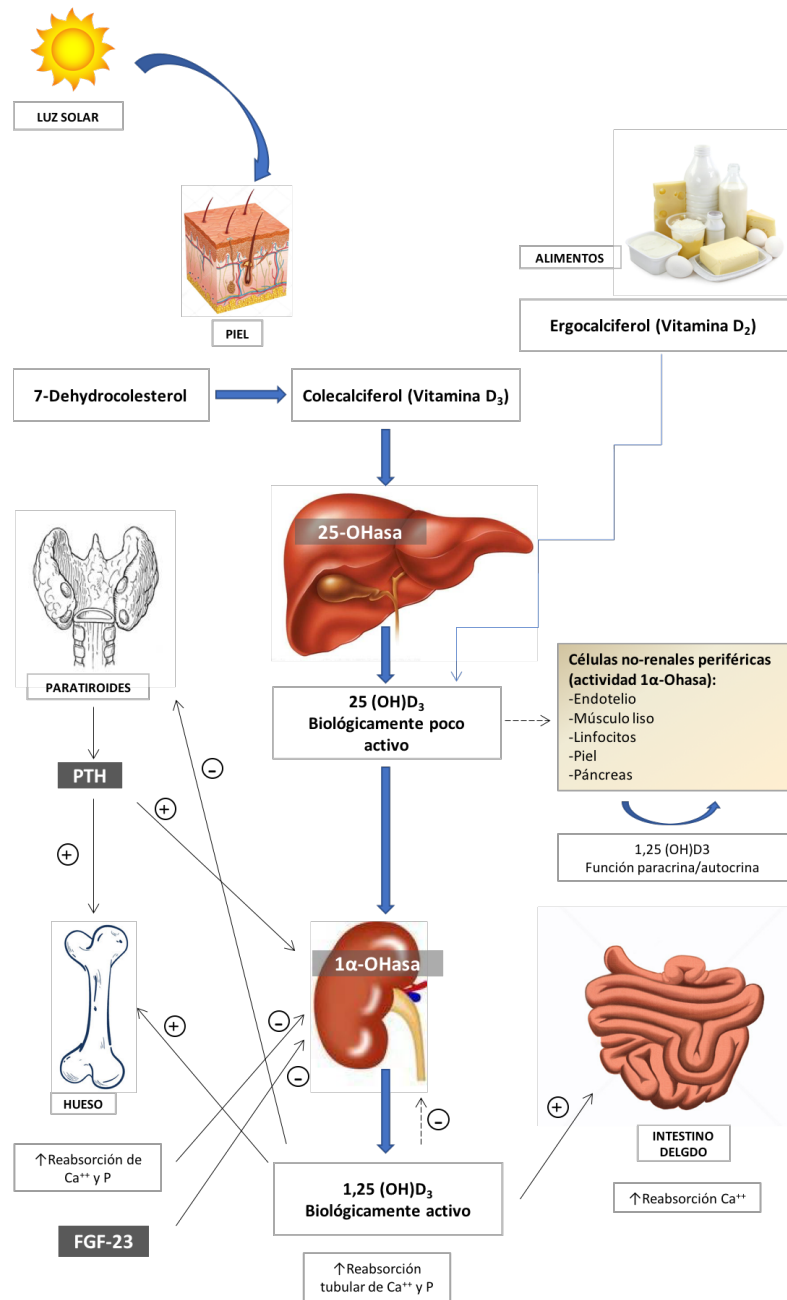


Figura 3. Vía metabólica de la vitamina D. La vitamina D es una prohormona sin actividad hormonal por sí misma. Debe convertirse en calcitriol a través de un mecanismo de síntesis muy regulado. La síntesis de colesterol en el hígado por medio de Acetil CoA es el primer paso. Luego se llega a un intermediario llamado 7-dehidrocolesterol. Por mediación de los rayos UV el 7-dehidrocolesterol sufre unas transformaciones produciendo vitamina D₃. Esta vitamina D₃ no es biológicamente activa por lo tanto debe ser sometida a dos hidroxilaciones: la primera en el hígado formando 25-hidroxicolecalciferol (calcidiol) y la segunda en el riñón formando 1,25-dihidroxicolecalciferol también llamada calcitriol (forma activa). La vitamina D₂ sigue el mismo proceso (sin necesidad de rayos UV) para formar 1,25-dihidroxi-ergocalciferol.

En las células de la piel, el 7-dehidrocolesterol sufre una fotólisis por la acción de la radiación ultravioleta para originar pre-Vitamina D3 y luego una isomerización térmica para originar vitamina D3 o colecalciferol (Figura 3).

El colecalciferol sufre dos hidroxilaciones sucesivas, la primera en el hígado mediante la hidroxilasa 25 (CYP2R1) dando lugar a 25-hidroxicolecalciferol [25(OH)D], cuyos niveles plasmáticos sirven como medidor de los niveles de vitamina D; ya que es fácil de medir, es abundante y tiene una vida media larga. La segunda hidroxilación se produce en el túbulo proximal del riñón y está catalizada por la 1- α -hidroxilasa mitocondrial (CYP27B1) produciendo 1,25-dihidroxicolecalciferol o calcitriol. Esta reacción se activa por la hormona paratiroidea (PTH) que se secreta en respuesta a concentraciones de calcio bajas y se suprime por FGF23, que se secreta en respuesta a niveles de fosfato altos.

El 1,25-dihidroxicolecalciferol, o 1,25(OH)D3, o calcitriol, es la forma hormonalmente activa de la vitamina D, que actúa tanto en los osteoblastos favoreciendo la formación de fosfato cálcico, como en el intestino estimulando la absorción de calcio y fósforo al torrente sanguíneo, mediante la estimulación de la síntesis de canales de calcio (TRPV6 y TRPV5) y de fosfato, así como de la proteína citoplásmica de unión al calcio, Ca^{2+} ATP-asa e intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. En el túbulo renal el calcitriol autorregula su propia homeostasis inhibiendo la 1- α -hidroxilasa. A pesar de ser la forma activa de la vitamina D, no se suele medir en sangre de forma rutinaria, ya que los niveles son tres órdenes de magnitud menores que los de 25-hidroxivitamina D y su vida media es muy corta. Todo ello, dificulta tanto la medida como la interpretación de los resultados en el contexto clínico.

En general, los niveles de vitamina D son menores en el invierno, por la falta de exposición solar, y gran parte de la población padece deficiencia de vitamina D en esta estación.

Los niveles séricos normales de 25(OH)D se estiman entre los 30-50 ng/mL, y las recomendaciones de aporte nutricional en la dieta varían en función de la edad y el grado de exposición al sol, pudiendo ser de 400-600 UI/día (10-15 mcg/día) en pacientes de 50-75 años de edad, aunque hay estudios que proponen dosis superiores ⁶⁵, habiéndose documentado que se pueden administrar de forma segura dosis de colecalciferol de hasta 10.000 UI/día ⁶⁶.

4.2. Asociación epidemiológica con el daño cardiovascular

Diferentes estudios han demostrado la relación entre la deficiencia de 25 hidroxivitamina D y las enfermedades cardiovasculares, incluyendo mayor mortalidad por todas las causas, hipertensión, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, enfermedad arterial periférica ^{67,68}, e incluso con aneurismas de aorta abdominal ⁶⁹.

Un meta-análisis de estudios observacionales examinó la asociación de las concentraciones de 25 hidroxivitamina D con trastornos cardiovasculares y metabólicos, concluyendo que las concentraciones de 25 hidroxivitamina D en suero más altas se asociaron con una reducción del 43% en la incidencia de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico ⁷⁰. También había una asociación entre las concentraciones de 25 hidroxivitamina D y la tensión arterial, donde cada aumento de 10 nmol/L en la concentración de 25 hidroxivitamina D se asociaba a una disminución en la presión arterial sistólica de aproximadamente 0,2 mmHg ⁷¹.

La vitamina D tiene un efecto directo en la expresión de genes que regulan la diferenciación y la proliferación de células musculares lisas de la pared arterial (IGF1, TGFβ3) ⁷². Los modelos animales también sugieren, en general, un efecto directo de la vitamina D sobre el conjunto del sistema cardiovascular. Así, los ratones knockout para VDR muestran corazones hipertróficos y fibrosis cardíaca ⁷³. También existe una clara evidencia de la relación causa-efecto entre la activación del VDR y la inhibición de citoquinas implicadas en la calcificación y formación de ateroma y el desarrollo de trombosis ⁷⁴.

El tratamiento con formas activas de vitamina D también mejora las lesiones por estrés oxidativo en algunos modelos experimentales ⁷⁵, reduciendo la síntesis de IL-6 y la actividad de transcripción NF-κB ⁷⁶, habiéndose documentado efectos beneficiosos de la 1, 25 (OH)2D3 sobre el desarrollo de hiperplasia intimal en modelos de anastomosis vasculares en conejos ⁷⁷.

A pesar de los datos observacionales y epidemiológicos, los estudios de intervención no dejan claro cómo la vitamina D podría afectar el riesgo cardiovascular ⁷⁸. Existen discrepancias entre meta-análisis que demuestran que los suplementos de vitamina D se asocian con una disminución en las tasas de mortalidad cardiovascular ⁷⁹, y otros que no

llegan a demostrar un efecto significativo de la suplementación de vitamina D sobre la mortalidad, los accidentes cerebrovasculares y el infarto de miocardio ⁸⁰.

Un problema de muchos estudios de suplementación de vitamina D o de prescripción de activadores del VDR es que mezclan pacientes con y sin déficit de vitamina D al comienzo de estudio. En los pacientes sin déficit de vitamina D no sería esperable que se beneficiasen de aportar dosis nutricionales de vitamina D.

4.3. VDR y paricalcitol

Las acciones biológicas del calcitriol y sus análogos sintéticos activos, como paricalcitol, están mediadas por el VDR, que es un factor de transcripción activado por ligando perteneciente a la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas / tiroideas ^{81,82}. Hay cuatro pasos para el control de la transcripción génica por parte del VDR:

- unión de ligando en la porción C-terminal de VDR (dominio de unión a ligando, LBD),
- heterodimerización con receptor retinoide X (RXR) por el LBD y translocación nuclear,
- unión de VDR-RXR por el dominio de unión a ADN de VDR a secuencias de ADN específicas en la región promotora de genes diana (elementos de respuesta VD: VDRE), y
- reclutamiento de proteínas nucleares que interactúan con VDR o DRIPs (co-reguladores o co-factores) que determinan transreacción de genes o transrepresión.

El equilibrio final entre co-activadores y co-represores determina el control de la transcripción de genes en presencia de estímulos fisiológicos y patológicos.

La distribución ubicua del VDR en el cuerpo humano (intestino, riñón, hueso, glándula paratiroidea, sistema inmunológico, músculo liso, y miocardio) es responsable de los efectos pleiotrópicos derivados de su activación, además de las relacionadas con la homeostasis mineral y ósea. Se han identificado VDR en más de 30 tejidos humanos

diferentes ⁸³. Entre los efectos pleiotrópicos, no clásicos de la vitamina D, destacan su efecto como inmunomodulador antiinflamatorio, sobre el remodelado cardiomiocitario, su efecto sobre la protección renal y el menor efecto sobre la progresión de la calcificación vascular, especialmente en algunos derivados ⁸².

Existen diferentes activadores de VDR. Además de la forma natural calcitriol, hay distintos análogos sintéticos de la vitamina D2 y D3 con posibilidad de regulación del metabolismo fosfo-cálcico, como el alfacalcidol, el doxercalciferol, el falecalcitriol, el maxacalcitol y el paricalcitol, que pueden tener ciertas ventajas farmacocinéticas y farmacodinámicas, con mayor vida media y menor inducción de hipercalcemia e hiperfosforemia.

El 25 hidroxivitamina D se une casi 100 veces menos ávidamente al VDR que el calcitriol ⁶⁴. Sin embargo, dado que los niveles de 25 hidroxivitamina D son 1000 veces superiores a los de $1\alpha,25$ dihidroxivitamina D, 25 hidroxivitamina D puede llegar a activar el VDR. Además, incluso en pacientes con insuficiencia renal crónica, en los que la actividad 1α -hidroxilasa renal es muy baja, la suplementación con 25 hidroxivitamina D aumenta la producción en suero de $1\alpha,25$ dihidroxivitamina D, probablemente a través de las α -hidroxilasas no-renales, aunque los niveles alcanzados no suelen ser suficientes ⁸⁴.

Por ello, en pacientes con enfermedad renal crónica con déficit adquirido de 1α -hidroxilasa se utiliza calcitriol como tratamiento para el hiperparatiroidismo secundario. Este se caracteriza por concentraciones anormalmente elevadas en suero de PTH, y anomalías en el calcio y fósforo séricos, secundario a bajas concentraciones de vitamina D activa por insuficiente producción renal. El calcitriol con frecuencia controla los niveles de PTH a costa de un aumento de hipercalcemia y de hiperfosfatemia, lo que clínicamente se traduce en complicaciones tales como calcificaciones vasculares (rigidez arterial y aumento de presión arterial) que pueden llevar a la hipertrofia del ventrículo izquierdo, arritmias, y aumento de mortalidad cardiovascular ⁸⁵. La tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular en pacientes con enfermedad renal en etapa terminal es 10 a 100 veces superior a la de personas de la población general de la misma edad ⁸⁶. Estudios en animales han demostrado como los suplementos de calcitriol pueden conllevar calcificaciones aórticas severas ⁸⁷, aunque otros le otorgan un papel protector en función de la dosis administrada ⁸⁸. Los nuevos análogos de vitamina D comprenden

un grupo de compuestos 1α - y 25-hidroxilados, que producen menos calcificación vascular en comparación con calcitriol. Estas moléculas actúan principalmente en la glándula paratiroidea, más que en el intestino y el hueso. Paricalcitol es un activador selectivo de VDR utilizado para el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario ⁸⁹. Su eficacia terapéutica se debe a la selectividad tisular de su mecanismo de acción, ya que no regula al alza el VDR intestinal y es menos activo que calcitriol a nivel óseo ^{90,91}. La menor incidencia de hipercalcemia en pacientes tratados con paricalcitol en comparación con calcitriol podría explicarse debido a la estimulación reducida de las proteínas de transporte de calcio intestinal (Calbindina)⁹². Además, paricalcitol modula el proceso de calcificación vascular mediante la supresión de inductores de calcificación tales como colágeno de tipo I, sialoproteína ósea, IL-1 β , y TNF- α , o por medio de activación de supresores de calcificación como osteopontina y osteocalcina ⁹³. Además, disminuye la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, presenta actividad inmunomoduladora, antioxidante y antifibrótica, evita la hipertrofia ventricular izquierda y tiene otra serie de ventajas desde el punto de vista cardiovascular que se han documentado tanto en estudios experimentales como observacionales ^{94,95}. Sin embargo, otros ensayos clínicos no llegaron a demostrar los beneficios de paricalcitol para evitar la hipertrofia del ventrículo izquierdo y preservar la fracción de eyección en pacientes con enfermedad renal ⁹⁶.

4.4. Metabolismo calcio/fósforo

El papel fisiológico clásico de la vitamina D es el de regulador de la homeostasis mineral y ósea. El calcitriol se une a los VDR y regula los niveles de calcio y fósforo séricos, aumentando su absorción en el intestino, la reabsorción de calcio en los túbulos renales y la supresión de la secreción de la PTH, que es a su vez un regulador clave del metabolismo mineral ⁹⁷. Por consiguiente, el déficit de vitamina D desempeña un papel central en el desarrollo del hiperparatiroidismo secundario, una complicación frecuente y precoz en los pacientes con enfermedad renal crónica, que progresa a medida que se va reduciendo el filtrado glomerular. El hiperparatiroidismo secundario y las alteraciones del metabolismo mineral producen fundamentalmente consecuencias clínicas a 2 niveles: en el sistema músculo-esquelético y en el sistema cardiovascular. Las consecuencias en el sistema músculo-esquelético son debidas al aumento del remodelado óseo, cuya lesión

habitual es la osteítis fibrosa. Las consecuencias en el sistema vascular se asocian al riesgo aumentado de calcificación vascular. Aunque pueda parecer que la enfermedad renal crónica afecta a un número limitado de personas, el 10% de los adultos y el 60% de los mayores de 80 años la padecen.

4.5. Efecto antiinflamatorio

Varios estudios epidemiológicos han relacionado el déficit de vitamina D con una mayor susceptibilidad a enfermedades mediadas por el sistema inmunitario, incluyendo infecciones crónicas y enfermedades autoinmunes ⁹⁸. También se conoce que las células inmunitarias expresan enzimas activadoras de la vitamina D, permitiendo la conversión local de la vitamina D inactiva a su forma activa, 1 α ,25 dihidroxivitamina D.

La acción inmunomoduladora de la vitamina D, ocurre a través de la regulación de la actividad de diversos tipos de células inmunitarias como los macrófagos, las células dendríticas y las células T, y de la regulación de la expresión de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias como RANTES y TNF- α , así como por la inhibición de la señalización del NF- κ B ⁹⁹. No obstante, los mecanismos moleculares últimos por los que los activadores del VDR limitan la inflamación y la lesión tisular no son todavía bien conocidos, incluyendo en el contexto de la EAP.

II. HIPÓTESIS

*“La verdad en ciencia puede ser
definida como la hipótesis de trabajo
que mejor se ajusta para abrir el camino
a la siguiente mejor ajustada”*

Konrad Lorenz

La enfermedad cardiovascular supone la primera causa de muerte en España. En el campo de la cirugía vascular, la hiperplasia intimal sigue siendo una complicación importante tanto en técnicas intervencionistas como en cirugía abierta.

La lesión endotelial produce alteraciones subclínicas en la expresión de genes en la pared vascular. A pesar de los avances en los conocimientos sobre su fisiopatología, esto no se ha traducido en regímenes terapéuticos eficaces para poder controlar definitivamente la progresión de esta enfermedad. Por eso, la hiperplasia intimal sigue siendo el principal obstáculo para conseguir resultados exitosos a corto y medio plazo en la permeabilidad de las angioplastias y los injertos de derivación. Las alternativas y tratamientos que existen hoy en día se podrían optimizar. Las observaciones clínicas de la asociación de los niveles bajos circulantes de vitamina D con peor pronóstico vascular, podrían explicarse por efectos de la activación del receptor de la vitamina D sobre la expresión de los genes implicados en el daño vascular.

En este sentido, consideramos que el mejor conocimiento de los factores que regulan el daño vascular, puede ayudar a diseñar nuevas estrategias terapéuticas. En concreto, hipotetizamos que el estudio de los factores modulados por paricalcitol puede identificar nuevas dianas terapéuticas, que deben ser validadas en estudios funcionales in vivo.

III. OBJETIVOS

*“Los obstáculos son aquellas aterradoras cosas
que ves cuando pierdes de vista tus objetivos”*

Hannah More

Objetivo general

Mejorar el conocimiento de la patogenia del daño vascular secundario a lesión endotelial, identificando nuevas vías moleculares, a fin de diseñar nuevas aproximaciones terapéuticas

Objetivos específicos

1. Caracterizar mediadores potenciales del daño vascular modulados por paricalcitol durante el daño vascular.
2. Caracterizar la función in vivo en el daño vascular de NIK, uno de los potenciales mediadores modulados por paricalcitol durante el daño vascular.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

“La teoría es cuando se sabe todo y nada funciona.

La práctica es cuando todo funciona y nadie sabe por qué.

En este caso hemos combinado la teoría y la práctica:

nada funciona... y nadie sabe por qué”

Albert Einstein

1. Diseño general del abordaje experimental

La Figura 4 muestra el diseño general del abordaje experimental. En un primer paso, se usó un modelo de rata para inducir lesión endotelial y vascular e identificar potenciales mediadores del daño tisular que pudieran explicar el efecto protector del paricalcitol. Se eligió la rata para este primer abordaje por resultar un modelo técnicamente más sencillo. En concreto, estudiamos mediadores para los que teníamos herramientas que permitían estudios funcionales posteriores *in vivo*. En un segundo paso, se eligió uno de los potenciales mediadores del daño tisular modulados por paricalcitol para estudios funcionales que demostrarán si realmente era un causante de daño vascular en este modelo. De los distintos mediadores identificados, abordamos en primer lugar la contribución de NIK, dejando los otros mediadores para estudios posteriores. Para estudiar la función de NIK, aprovechamos la disponibilidad de ratones deficientes en NIK, por lo que este segundo modelo se realizó en ratones. Técnicamente, el uso secuencial de ratas y ratones, facilitó la progresiva adquisición de pericia con el modelo.

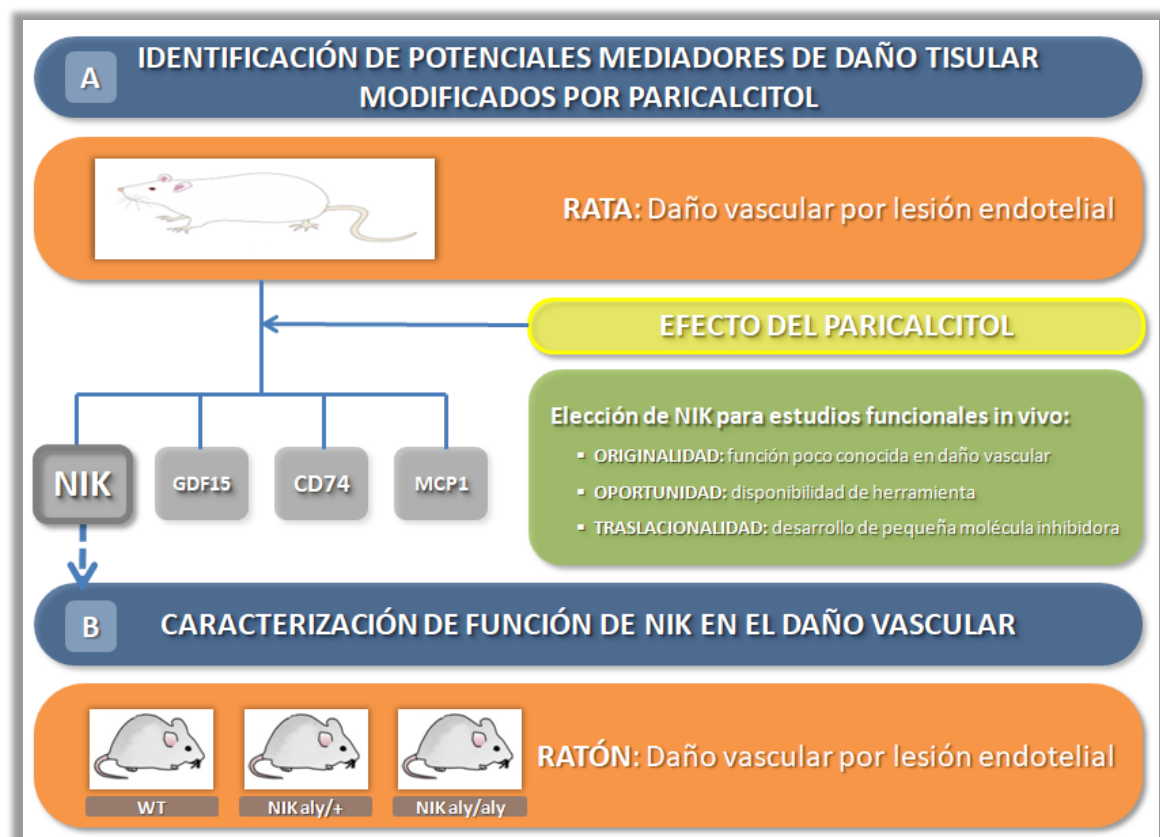


Figura 4. Diseño general del abordaje experimental

2. Modelos experimentales

Los estudios en animales se realizaron de acuerdo a las Guías de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, respetando la normativa nacional vigente.

Las figuras 5 y 6 reflejan la aproximación experimental. En resumen, se realizaron modelos de daño endotelial mecánico en arterias femorales de ratas y de ratones. En ratas, un grupo se trató con el activador del receptor de la vitamina D paricalcitol. En ratones, se empleó un grupo de ratones modificados genéticamente para evaluar la función de NIK. En las muestras de arteria se estudió por un lado la lesión endotelial mediante histomorfometría; por otra parte, se cuantificó la expresión de mRNA mediante RT-PCR cuantitativa y se localizaron las células que expresaban las proteínas mediante inmunohistoquímica. Por último, utilizamos el plasma de estos animales para analizar la expresión de proteínas mediante ELISA.

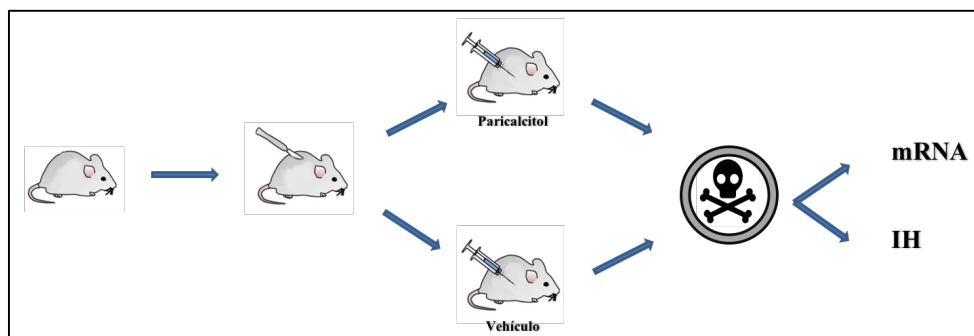


Figura 5. Modelo experimental en ratas. Todas las ratas fueron sometidas a una intervención quirúrgica en la que se dañaba el endotelio de la arteria femoral izquierda mediante técnica de raspado con guía vascular, y se simulaba una intervención similar, pero sin raspado en la arteria femoral derecha. Se hicieron dos grupos a uno de los cuales se les administraba paricalcitol y al otro vehículo durante 2 semanas. El sacrificio de todos los especímenes se realizó a los 14 días de la intervención. De cada paquete arterial se obtuvieron muestras para mRNA y para estudio inmunohistoquímico y morfométrico.



Figura 6. Modelo experimental en ratón. Se establecieron 3 grupos de ratones Wild-type ($NIK^{+/+}$), homocigotos deficientes en NIK ($NIK^{aly/aly}$), y heterocigotos ($NIK^{+/aly}$). Todos los ratones fueron sometidos a una intervención quirúrgica en la que se dañaba el endotelio de la arteria femoral izquierda mediante técnica de raspado con guía vascular, y se simulaba una intervención similar, pero sin raspado en la arteria femoral derecha. El sacrificio de todos los especímenes se realizó a los 14 días de la intervención. De cada grupo, las arterias de unos ratones se destinaron a estudio de mRNA y las de otros a estudio inmunohistoquímico y morfométrico.

2.1. Modelos de daño endotelial en rata

Se utilizaron 2 grupos de ratas Wistar Kyoto, hembras de 2 meses de edad. Aunque los estrógenos son protectores frente a la aterogénesis, su papel en la formación de neoíntima no está bien definido¹⁰⁰. Ambos grupos se sometieron a un idéntico protocolo quirúrgico de daño endotelial en la arteria femoral. A uno de los grupos se le inyectó vitamina D (Paricalcitol) vía intraperitoneal, a una concentración de 750 ng/kg de peso desde el mismo día de la intervención con una cadencia de cada 2 días durante un periodo de 2 semanas⁹⁹. El grupo control recibió inyecciones de vehículo (Alcohol 20 % v/v, propilenglicol y agua purificada) bajo el mismo protocolo de duración y periodicidad.

La lesión endotelial de la arteria femoral se llevó a cabo mediante la canulación de una guía de angioplastia (Figura 7), según técnicas previamente descritas^{100,101}. Se usó una guía de 0,014" (0,35 mm) de diámetro (*1000462H*: Abbott Hi-Torque Balance Heavyweight Guide Wire 0.014" x 190cm)¹⁰².

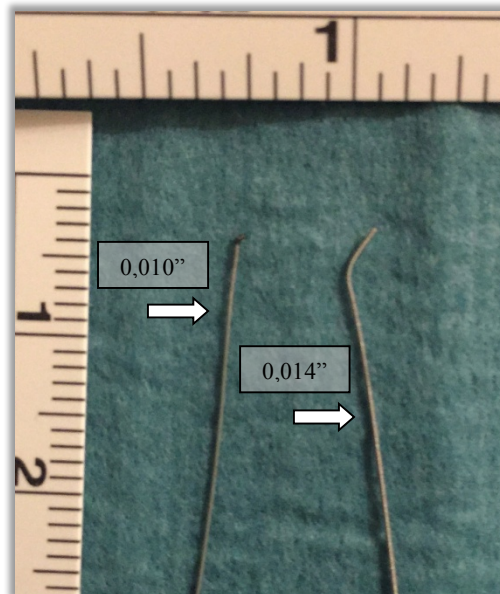


Figura 7. Guías de angioplastia de 0,010" y 0,014" de diámetro.

La anestesia general se realizó mediante protocolo de inhalación de isofluorano. Mientras se observa bajo un microscopio quirúrgico, se realiza una incisión en la cara interna de la pata a la altura de la articulación, sobre el paquete femoral. Se disecciona cuidadosamente la arteria femoral en el trayecto mínimamente posible para poder realizar la arteriotomía, y se controla con una seda quirúrgica de 7/0 Silkam®, que puede hacer las veces de ligadura. A continuación, se realiza una arteriotomía transversa con tijeras, distal a la seda. Habitualmente el sangrado es mínimo, pero puede ligarse temporalmente la arteria con la misma seda en caso de que éste no ceda. Seguidamente se inserta la guía de forma manual con la ayuda de pinzas, y se avanza retrógradamente hasta el nivel de la bifurcación aórtica. Realizamos movimiento de frotamiento circular y antero-posterior durante un periodo de 30 segundos y a continuación se retira la guía. Para evitar el sangrado, se liga la arteria con la seda colocada proximalmente. El sangrado retrogrado es infrecuente y cede con compresión manual durante 1 minuto. El mismo protocolo de lesión se llevó a cabo en el lado contralateral, mediante control de la arteria femoral y ligadura de la misma, pero sin paso de la guía, para usarlas como controles de cirugía simulada. La lesión endotelial siempre se realizó en la arteria femoral izquierda y se reservó la arteria femoral derecha como control de cirugía simulada.

El tiempo quirúrgico de la intervención bilateral de las arterias femorales en cada rata fue de 20 a 30 minutos. Se intervinieron 7 ratas para el grupo que recibió Paricalcitol y 5 ratas para el grupo control. No hubo fallecimientos ni inconvenientes reseñables en el grupo de las ratas control. De las 7 ratas del grupo de Paricalcitol, una murió durante la intervención por fallo en la inducción anestésica, otra en el postoperatorio sin que se objetivara la causa y 5 fueron intervenidas satisfactoriamente. No obstante, en el grupo de Paricalcitol con daño, una de las muestras arteriales no fue válida por trombosis completa de toda la arteria por lo que el grupo quedó limitado a 4 muestras.

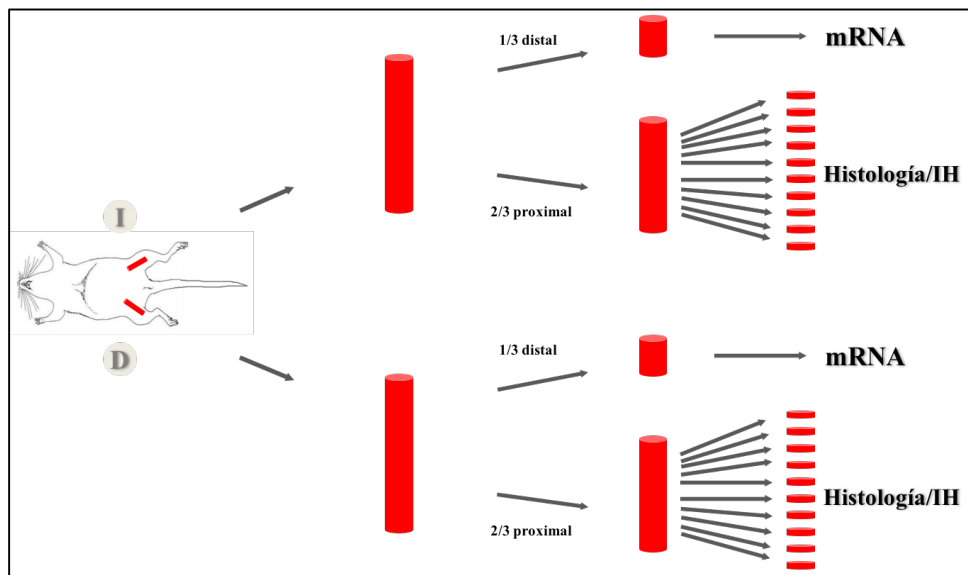


Figura 8. Procesamiento de muestras arteriales en modelo de rata. El procedimiento quirúrgico para causar daño endotelial se realizó sobre la arteria femoral izquierda (I) en todos los casos. Sobre la arteria derecha (D) se realizó un procedimiento simulado sin provocar daño endotelial. Tras el sacrificio de los especímenes, se extrajeron ambos paquetes vasculares femorales. El tercio más distal se destinó a estudios de biología molecular y proteínas. El estudio inmunohistoquímico se realizó en los dos tercios proximales del paquete vascular. Para estudiar el grado de daño endotelial a lo largo de toda la arteria, se realizaron 10 secciones consecutivas de la arteria para realizar diferentes tinciones.

Tras el sacrificio se realizó perfusión con 20 mL de solución salina al 0,9% mediante inyección directa en el ventrículo izquierdo del corazón, facilitando su salida a través de una arteriotomía practicada proximalmente a la ligadura de las femorales. A continuación, se extrajeron los paquetes femorales hasta la bifurcación aórtica. Para el procesamiento inmunohistoquímico, las muestras se sumergieron en paraformaldehído al 4% en tampón

PBS para su posterior inclusión en parafina. La parte más distal de las arterias femorales se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para estudios de biología molecular y proteína (Figura 8).

2.2. Modelo de daño endotelial en ratón

Para explorar el papel de NIK, una quinasa implicada en la activación no canónica de NFκB codificada por el gen MAP3K14, en la hiperplasia intimal se utilizaron ratones macho C57/Bl6 de 2 meses de edad. Los ratones NIK^{aly/aly}, tienen una actividad deficiente de NIK debido a una mutación puntual (mutación NIK^{aly}) que causa una sustitución de aminoácidos en el dominio de interacción carboxi terminal de NIK que inactiva la enzima 103,104.

Se establecieron 3 grupos de ratones: Wild-type (NIK^{+/+}), ratones homocigotos completamente deficientes en NIK (NIK^{aly/aly}), y ratones heterocigotos parcialmente deficientes en NIK (NIK^{+/aly}), procedentes de las instalaciones del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO, Madrid, España).

Todos se sometieron a un idéntico protocolo quirúrgico de daño endotelial en la arteria femoral (figura 8), que difirió del procedimiento en ratas en que se usó una guía de 0,010" (0,25 mm) de diámetro (103-0601-300: ev3 X-celeratorTM-10 Exchange Hydrophilic Guidewire: 0.010" x 300cm)¹⁰⁰ (Figura 9). El tiempo quirúrgico de la intervención bilateral de las arterias femorales en cada ratón fue de 10 a 20 minutos. Para obtener las muestras destinadas a inmunohistoquímica, se intervinieron 5 ratones Wild Type como grupo control, 6 ratones homocigotos deficientes en NIK (NIK^{aly/aly}) y 5 ratones heterocigotos (NIK^{+/aly}) para la mutación. Hubo un fallecimiento perioperatorio tanto en el grupo control como en el grupo de heterocigotos. Para las muestras de mRNA se intervinieron 5 ratones Wild Type y 5 ratones homocigotos deficientes en NIK (NIK^{aly/aly}).

A los 14 días todos los animales fueron sacrificados mediante inyección de 5 mg/100 g de pentobarbital sódico. Se congelaron 5 muestras de la arteria femoral aislada de cada grupo inmediatamente en nitrógeno líquido para estudios de biología molecular y proteína.

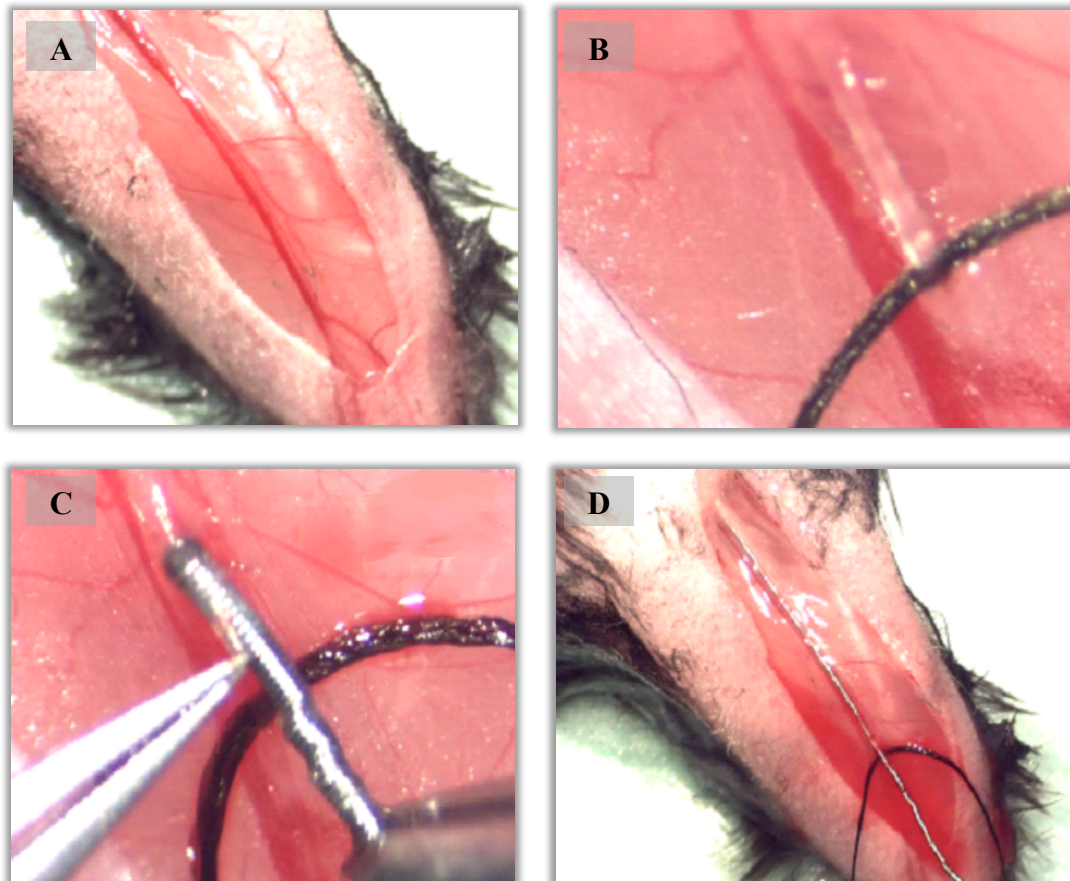


Figura 9. Procedimiento quirúrgico para lesión endotelial por daño mecánico. A) Exposición del paquete femoral. B) Disección y control de la arteria femoral. C) Arteriotomía transversal e introducción de guía vascular. D) Progresión de la guía a través de la arteria femoral

3. Estudio Histológico y Morfométrico

3.1. Histología

Se utilizaron secciones de 2 μm de tejido incluido en parafina que se montaron sobre portaobjetos pretratados con APES al 2% en acetona.

Al procesar los bloques de parafina, para asegurar una distribución equitativa y aleatoria del daño endotelial realizado sobre las arterias, se obtuvieron cortes representativos de 10 segmentos de cada una de ellas. De esta forma, el resultado numérico que obtenemos al analizar la muestra en el estudio histomorfométrico, resulta del promedio de daño

realizado sobre toda la extensión arterial, y no queda limitado a una única zona de lesión que pudiera ser o no ser representativa. Además, de cada segmento se obtuvieron 6 cortes, uno de ellos destinado a tinción con hematoxilina-eosina para el estudio histológico e histomorfométrico, y el resto para estudio de inmunohistoquímica.

3.2.Histomorfometría

A fin de evaluar el daño arterial, se obtuvieron secciones representativas de toda la extensión de la arteria de tal forma que no se concretara el daño endotelial o la ausencia del mismo en un único punto, y se pudiera obtener una media aproximada del daño a lo largo de toda la muestra. Se descartaron aquellos cortes en los que se hubiera producido una trombosis completa del vaso.

En las muestras teñidas con hematoxilina se calcularon el área de la luz del vaso, el área de la hiperplasia intimal y el área de la media arterial con el sistema de análisis de imagen cuantitativo Image Pro Plus (Media Cibernetics, MD, EEUU). El porcentaje de estenosis y la ratio íntima-media (I/M) se calcularon usando la fórmula descrita en otras publicaciones previas^{105,106}:

$$\text{I/M} = \text{Área de la íntima} / \text{Área de la media}$$

$$\% \text{ estenosis} = 100 \times [\text{Área de la íntima} / (\text{Área de la luz} + \text{Área de la íntima})]$$

Los resultados de cada una de las muestras arteriales representan la media de todas las secciones analizadas.

4. Estudio de proteínas

Las proteínas en plasma se estudiaron por ELISA y en el tejido por inmunohistoquímica.

4.1.ELISA

La concentración circulante de MCP-1 se determinó en 100 µl de plasma de ratón por duplicado mediante un kit de ELISA disponible comercialmente (BD Pharmigen). Los valores se expresaron en pg/mL. El ensayo se calibró utilizando una curva estándar con concentraciones conocidas de MCP-1 soluble.

4.2.Inmunohistoquímica

Como se ha indicado previamente, se utilizaron secciones de 2 µm de montados sobre portaobjetos pretratados con APES al 2% en acetona. Una vez desparafinadas y rehidratadas en concentraciones decrecientes de etanol, las secciones se incubaron durante 30 minutos en 3% H₂O₂: metanol (1:1) para bloquear la peroxidasa endógena. Tras lavar en PBS se incubaron 1 hora en 6% de suero del huésped en el que se obtuvo el anticuerpo secundario, 4% albúmina sérica bovina (BSA) en PBS. A continuación, se incubó durante 18 h a 4°C con los anticuerpos primarios, disueltos en 1% suero, 4% BSA en PBS. Tras la incubación con los anticuerpos primarios se lavaron en PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con biotina (1/200, Amersham), disueltos en 4% BSA-PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras incubadas con anticuerpo secundario conjugado con biotina, se trataron con el complejo ABC-HRPO (DAKO, Glostrup, Dinamarca) durante 30 min a 37 °C. La localización del anticuerpo se determinó mediante la adición del cromógeno DAB (Dako): 3% H₂O₂ (130:1) durante 5-10 min. Por último, se aplicó a las secciones una tinción de fondo con hematoxilina de Carazzi (Bio-Optica, Milán, Italia), se deshidrataron y montaron en DPX (BDH, Poole, Inglaterra). Los controles negativos se incubaron sin anticuerpo primario. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD74 (Santa Cruz Biotechnology) 1:50.
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-MCP1 (Santa Cruz Biotechnology) 1:100.
- Anticuerpo policlonal de rata anti-F4/80 (Serotec, Oxford, UK, 1:50).
- Anticuerpo policlonal de rata anti-CD43 (Beckton Dickinson) 1:50.
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-NIK (Cell Signaling, 1:100).

La elección del corte sobre el que se realizaba el estudio inmunohistoquímico se hizo en base al segmento que coincidía con el valor correspondiente a la mediana del valor I/M en el estudio de histomorfometría.

5. Estudios de expresión de mRNA: transcripción inversa y PCR a tiempo real

El ARN total del tejido se extrajo siguiendo las instrucciones del kit comercial “RNeasy Micro Kit” (Qiagen), que está diseñado para la purificación de hasta 45 µg de ARN de pequeñas muestras de tejido. La cuantificación del ARN se realizó por medida de la absorbancia de las muestras a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 ng/ml de ARN. Se comprobó que la relación entre las absorbancias 260 y 280 nm era cercana a 2, indicando pureza de la muestra y ausencia de contaminación por proteínas o residuos químicos. La transcripción inversa se realizó con un µg de ARN utilizando el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, EEUU).

La PCR a tiempo real se realizó mediante el sistema de detección secuencial ABI Prism 7500 usando una Taq DNA polimerasa activada por temperatura (Amplitaq Gold). Después de un periodo inicial de 2 minutos a 50 °C y de 10 minutos 95 °C, las muestras se amplificaron en 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. En paralelo junto con el gen de interés, se amplificó el RNA de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), para utilizarlo como control interno. Los resultados de la amplificación del gen de interés se normalizaron con los datos obtenidos de GAPDH, utilizado como control. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

6. Análisis estadístico de los datos

El análisis se desarrolló usando el programa estadístico SPSS 11.0. Los datos se expresan como media ± desviación estándar (media ± DS). La significación estadística a un nivel

de $p < 0,05$ se estableció mediante el empleo del test t de Student para dos grupos de datos y ANOVA para 3 o más grupos.

Para el estudio morfométrico, las comparaciones se han realizado con pruebas no paramétricas, dado que el tamaño de muestra era pequeño. Para las comparaciones de dos grupos se ha utilizado la prueba de Mann-Whitney, y para las comparaciones de tres grupos se ha utilizado la prueba de Kruskal-Wallis.

V. RESULTADOS

“Prueba otra vez.

Fracasa otra vez.

Fracasa mejor”

Samuel Beckett

1. Daño endotelial en rata: impacto del paricalcitol y mecanismos moleculares implicados

Como aproximación inicial en la búsqueda de mediadores del daño vascular, abordamos el impacto del paricalcitol y las moléculas que modulaba.

1.1.El paricalcitol tiende a disminuir la hiperplasia intimal y la estenosis secundaria a la lesión endotelial

Establecimos 4 grupos de muestras arteriales en función de la lesión y de la administración de Vitamina D. Las muestras se estudiaron a los 14 días de la intervención:

- Dos grupos de muestras obtenidos de las ratas tratadas con vehículo:
 - Arterias control sanas (n=5)
 - Arterias control con daño (n=5)
- Dos grupos de muestras obtenidos de las ratas tratadas con paricalcitol:
 - Arterias Paricalcitol sanas (n=5)
 - Arterias Paricalcitol con daño (n=4)

1.1.1. Hallazgos Histológicos

Se estudiaron muestras arteriales teñidas con Hematoxilina-Eosina de los diferentes segmentos arteriales de todos los grupos.

Los dos grupos de arterias sanas, esto es, sin daño u operadas simuladamente, tenían un aspecto normal en el 100% de los casos. El endotelio estaba intacto, y no había evidencia de trombo, daño en la pared arterial o engrosamiento de la íntima. Ninguna de las muestras histológicas de estos grupos presentaba lesiones proliferativas de ningún tipo en la íntima. La capa media no presentaba indicios de proliferación celular y el aspecto de la misma resultaba, en líneas generales, bastante homogéneo entre las distintas muestras de ambos grupos.

No se observó alteración de la lámina elástica externa en ningún grupo. En definitiva, no hubo diferencias histológicas apreciables entre el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con paricalcitol.

En los grupos de arterias a las que se les realizó denudación endotelial con guía vascular, esto es, con daño u operadas, se encontraron signos histológicos de hiperplasia intimal en diferentes grados. En todos los especímenes se encontró algún indicio de lesión en al menos una muestra de los diferentes segmentos arteriales estudiados. El grado de regeneración endotelial e hiperplasia, también fue variable en los distintos segmentos de una misma arteria. Esto es explicable en relación a:

- a) el calibre de la luz arterial a lo largo de su trayecto;
- b) la ineficacia del raspado endotelial en determinados puntos en función de las características de la guía vascular que fue empleada para el procedimiento.

La oclusión arterial por trombosis completa se dio en uno de los especímenes tratados con paricalcitol por lo que la muestra fue desechada. La hiperplasia intimal, definida como cualquier lesión proliferativa dentro del margen circunferencial de la lámina elástica interna (LEI), se encontró en mayor o menor medida en el resto de las muestras operadas que fueron examinadas. Esta proliferación se produce a expensas de células inflamatorias y células musculares lisas migradas desde la capa media. Asimismo, se apreciaba un aumento evidente de la celularidad en la capa media como consecuencia de la actividad inflamatoria.

En el grupo tratado con paricalcitol se evidenció una marcada disminución de la hiperplasia intimal cuando se comparó con el grupo no tratado, que en muchos casos llegaba a ser casi completa. Sin embargo, en todos los casos se apreciaba el mencionado aumento de grosor de la capa media y la correspondiente proliferación celular. Esto hacía pensar que la ausencia de hiperplasia intimal no era consecuencia de una ausencia de daño en esa zona, sino a un efecto antiproliferativo producido por el paricalcitol.

No se observó alteración de la lámina elástica externa en ningún grupo (Figura 10).

1.1.2. Análisis Morfométrico

La histomorfometría de las arterias lesionadas se resume en las Tablas 1 y 2.

En los grupos de arterias operadas de forma simulada, al no haber lesiones proliferativas de ningún tipo, su relación íntima/media (I/M) era cero. No hubo diferencias significativas en el área total del vaso ni en el área de la media entre las muestras de arterias simuladamente operadas del grupo control y del grupo de paricalcitol.

Con respecto a los grupos en los que se realizó denudación endotelial, encontramos que el área media de la íntima, a las 2 semanas de intervención, era $1040992 \pm 540916 \text{ pixels}^2$ en el grupo control tratado con vehículo y $716501 \pm 449553 \text{ pixels}^2$ en el grupo control tratado con paricalcitol ($p=0,29$). Esta medida se tradujo en una relación I/M de $0,24 \pm 0,15$ y $0,17 \pm 0,12$ ($p=0,41$) y un porcentaje de estrechamiento luminal de $73,12 \pm 20,77$ % y $36,51 \pm 36,44$ % en ambos grupos respectivamente. Aplicando la prueba de Mann-Whitney, a pesar de la magnitud de la diferencia solo se observó una tendencia ($p=0,11$) hacia una diferencia significativa, probablemente por la reducida n , al perder una de las muestras de paricalcitol. Además, uno de los especímenes tratados con paricalcitol presentaba un grado de hiperplasia mucho más marcado que el resto de las muestras de su grupo. Esta circunstancia desviaba la distribución de los datos respecto a la media aritmética, como puede observarse en los resultados de las medidas de dispersión (DS). Interpretamos, por lo tanto, que este valor estaba en desacuerdo con nuestro modelo teórico, aunque no hemos podido determinar por qué circunstancia (tabla 2). Por otra parte, las arterias dañadas presentaban un aumento generalizado del área total del vaso frente a las arterias no dañadas, siendo esta diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con paricalcitol ($p=0,032$), pero no en los grupos tratados con vehículo ($p=0,69$). También se producía un aumento en el área de la capa media que guardaba la misma significación estadística entre los grupos mencionados. Las fotografías muestran el citado aumento del área total del vaso y, en detalle, cómo en las ratas tratadas con paricalcitol, la hiperplasia intimal era menor que en el grupo control (Figura 10).

Estos resultados, en líneas generales, concuerdan con los datos publicados en la literatura

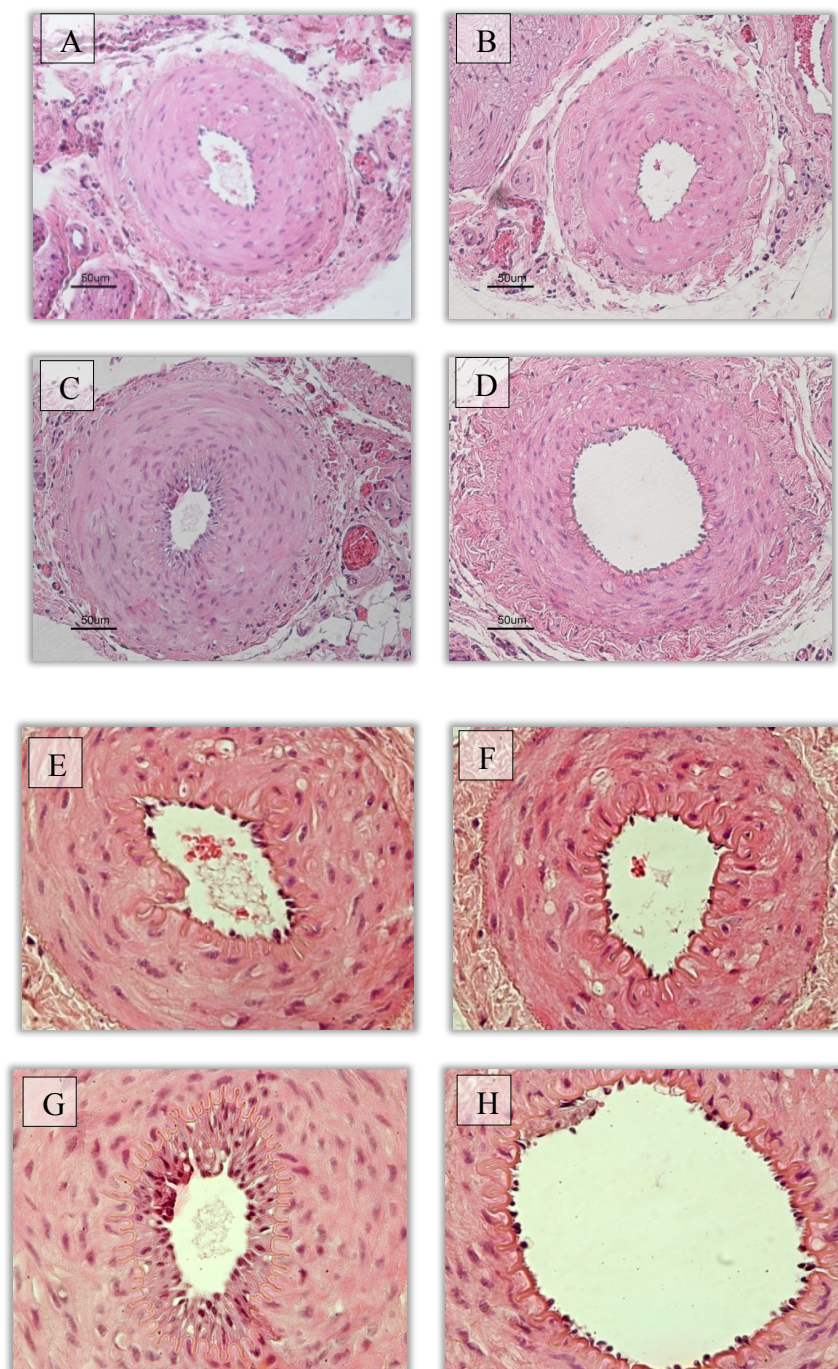


Figura 10. Respuesta proliferativa a la lesión endotelial en arterias femorales de rata. Tinción con HE de muestras representativas de los distintos grupos. Con aumentos a 20x, se aprecia un aumento del tamaño del vaso en las arterias que sufrieron daño endotelial (C y D) respecto a las arterias simuladamente operadas (A y B). Se produce una acumulación de células inflamatorias y células musculares lisas migradas desde la capa media, que sumado a la agregación plaquetaria y de fibrina, produce la disminución de la luz del vaso. . En las arterias dañadas del grupo que recibió paricalcitol (D) se aprecia una evidente disminución del engrosamiento intimal respecto al grupo dañado sin paricalcitol (C), pero no del calibre total de la arteria. Las imágenes E, F, G y H corresponden a las mismas secciones arteriales con aumentos a 40x en las que se hace más evidente el grado de hiperplasia intimal delimitado por la lámina elástica interna.

Tabla 1. Histomorfometría del daño arterial en rata. Áreas medidas en pixels², con aumento en microscopio de (x20), expresadas como la media \pm DS de las medias de los especímenes de cada grupo.

	Sano control	Daño control	Sano Paricalcitol	Daño Paricalcitol
n	5	5	5	4
Área del vaso	4414692 \pm 1681851	5196269 \pm 665821	3832323 \pm 1559675	6874667 \pm 1040505*
Área de la media	3749691 \pm 1459840	3778380 \pm 858371	2941447 \pm 806131	4726640 \pm 550746*
Área de la íntima	0 \pm 0	1040992 \pm 540916	0 \pm 0	716501 \pm 449553
Área de la luz	665001 \pm 603191	376888 \pm 413468	890876 \pm 775657	2771844 \pm 324325
Ratio Intima/Media	0 \pm 0	0,24 \pm 0,15	0 \pm 0	0,17 \pm 0,12
% estenosis	0 \pm 0	73,12 \pm 20,77	0 \pm 0	36,51 \pm 36,44

*p=0.032 vs Sano Paricalcitol

Tabla 2. Histomorfometría del daño arterial en rata: comparación de arterias con daño. Áreas medidas en pixels², con aumento en microscopio de (x20), expresadas como la media \pm DS de las medias de los especímenes de cada grupo.

	Daño control	Daño paricalcitol	P
Área del vaso	5196260 \pm 665821	6874667 \pm 1040505	0,11
Área de la luz	376888 \pm 413468	2771844 \pm 3243125	0,11
Área de la media	3778380 \pm 858371	4726640 \pm 550746	0,11
Área de la íntima	1040992 \pm 540916	716501 \pm 449553	0,29
I/M	0,24 \pm 0,15	0,17 \pm 0,12	0,41
% estenosis	73,12 \pm 20,77	36,51 \pm 36,44	0,11

Las figuras 11 y 12 presentan los principales resultados de forma gráfica:

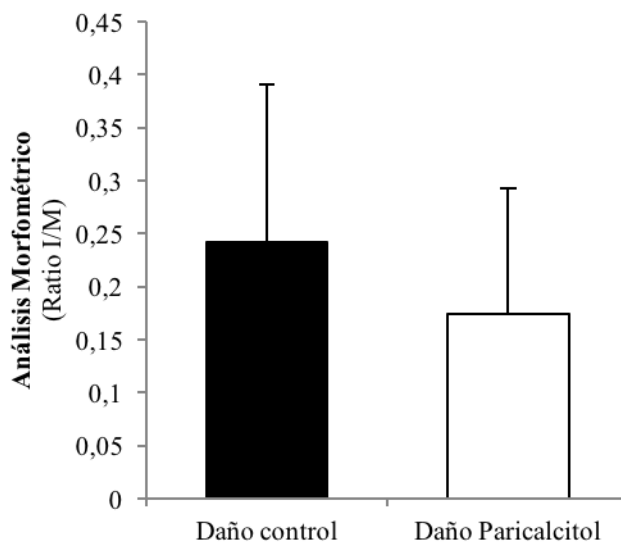


Figura 11. Relación íntimo-medial entre los vasos dañados de ratas tratadas con vehículo o paricalcitol. La tendencia no significativa a la disminución de la relación íntima-media en el grupo de paricalcitol se produce principalmente a expensas de una disminución en el área de la íntima, ya que el área medial es en términos relativos similar en ambos grupos.

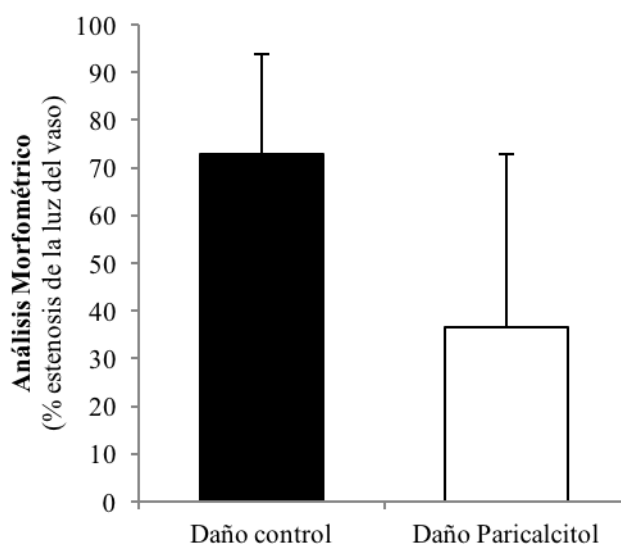


Figura 12. Porcentaje de estenosis en la luz de los vasos dañados de ratas tratadas con vehículo o paricalcitol. Se aprecia una disminución del porcentaje de estenosis en las arterias tratadas que se aproximó a la significación estadística ($p=0,11$).

1.2.Potenciales mediadores del daño intimal en ratas

A continuación, exploramos potenciales mediadores de la hiperplasia intimal secundaria al daño endotelial y el efecto del paricalcitol. Para ello estudiamos la expresión génica a nivel de mRNA mediante RT-PCR cuantitativa de una serie de mediadores del daño tisular con potencial teórico tanto para modular la lesión tisular como para ser dianas terapéuticas. Estos mediadores tenían a su vez en común la disponibilidad en el laboratorio para estudiar su participación en la lesión intimal de forma directa in vivo mediante ratones modificados genéticamente que sobreexpresan y/o son deficientes en el gen en cuestión (receptor CD74, factor de crecimiento GDF15, quinasa apical de la vía no canónica de activación de NFκB: NIK) o mediante anticuerpos neutralizantes (MCP-1). Además, los cambios en la expresión se confirmaron a nivel de proteína mediante inmunohistoquímica (CD74 y NIK) o ELISA (MCP1).

1.2.1. Durante la hiperplasia intimal secundaria al daño endotelial en ratas, el paricalcitol disminuye la expresión de GDF15

El factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF 15) es una citoquina sensible al estrés. Se expresa en diferentes tipos de estirpes celulares incluidas células de músculo liso vascular en condiciones normales y patológicas. GDF-15 aumenta durante la lesión tisular y se asocia con riesgo cardiometabólico. La deficiencia de GDF-15 en ratones previene la formación de placa aterosclerótica¹⁰⁸, presumiblemente mediante la regulación de la apoptosis celular y de la respuesta inflamatoria dependiente de IL 6⁵⁷.

Para evaluar la implicación de GDF15 en la hiperplasia intimal secundaria a denudación endotelial, medimos los niveles de mRNA mediante transcripción inversa y RT-PCR utilizando el 1/3 más distal de la muestra arterial de cada espécimen.

En la arteria dañada de ratas control se observó un aumento de la expresión de GDF15 a nivel de mRNA con respecto a la arteria sin daño del mismo grupo (figura 13). El tratamiento con paricalcitol disminuye la expresión de mRNA de GDF15.

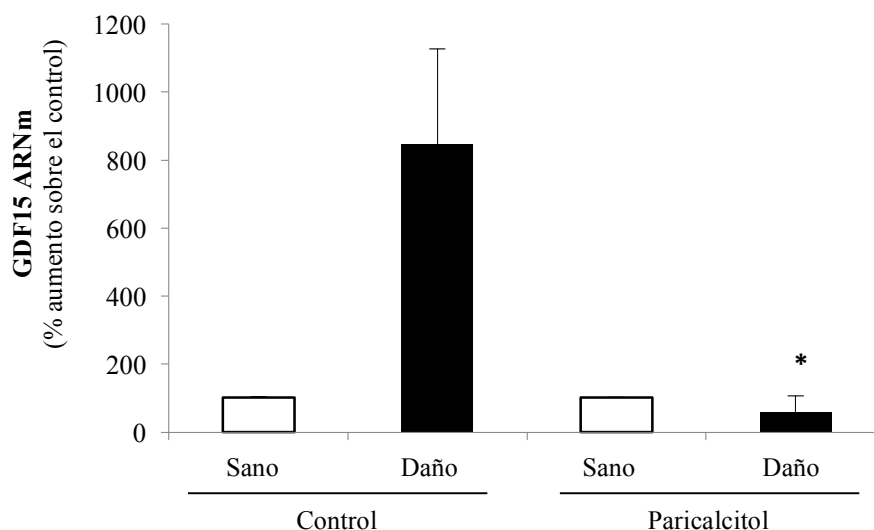


Figura 13. Durante el daño vascular aumenta la expresión de mRNA de GDF15 y paricalcitol lo evita. La expresión de mRNA de GDF15 en la arteria se estudió por RT-PCR. Datos expresados como % de aumento sobre la arteria sana del grupo control. (* $p < 0,01$ vs Daño Control).

1.2.2. Durante la hiperplasia intimal secundaria al daño endotelial en ratas, el paricalcitol disminuye la expresión de CD74

CD74 es un receptor de membrana de la citoquina MIF (macrophage migration inhibitory factor) implicada en procesos de aterogénesis y remodelación arterial secundaria a lesión endotelial. En la arteria dañada se observó un aumento de la expresión de CD74 a nivel de mRNA con respecto a la arteria sin daño del mismo grupo. El tratamiento con paricalcitol disminuyó su expresión (figura 14).

A continuación, exploramos los cambios en la proteína CD74. Si bien se expresaba de forma constitutiva en toda la pared arterial, como así se evidenciaba en las arterias no dañadas, parecía observarse un aumento de la expresión de CD74 en las arterias lesionadas del grupo control con respecto a la arteria sin daño del mismo grupo. Este aumento se localizó de forma significativa en el endotelio y en la capa media de la arteria. El tratamiento con paricalcitol disminuyó la expresión de CD74 en la capa media y la limitó a la capa endotelial (figura 15).

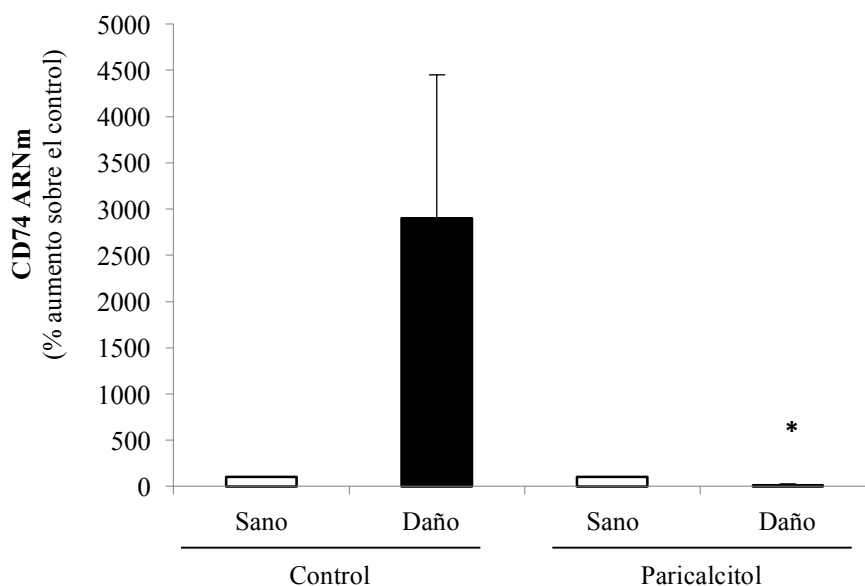


Figura 14. Durante el daño vascular aumenta la expresión de mRNA de CD74 y paricalcitol lo evita. La expresión de mRNA de CD74 en la arteria se estudió por RT-PCR. Datos expresados como % de aumento sobre la arteria control contralateral. (* $p < 0,01$ vs Daño Control).

1.2.3. Durante la hiperplasia intimal secundaria al daño endotelial en ratas, el paricalcitol disminuye la expresión de NIK

La activación canónica de NF κ B en el daño arterial ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, la activación a través de la vía no canónica y sus componentes está mucho menos caracterizada. Para abordarla, estudiamos la expresión de NIK, la quinasa apical de la vía de activación no canónica del NF κ B, en el tejido arterial de rata.

Los niveles de mRNA arterial se evaluaron mediante RT-PCR cuantitativa. En el grupo de ratas control, se observó un aumento de la expresión de NIK a nivel de mRNA en la arteria dañada con respecto a la arteria sin daño del mismo grupo. El tratamiento con paricalcitol disminuyó la expresión de NIK con respecto al grupo no tratado (figura 16).

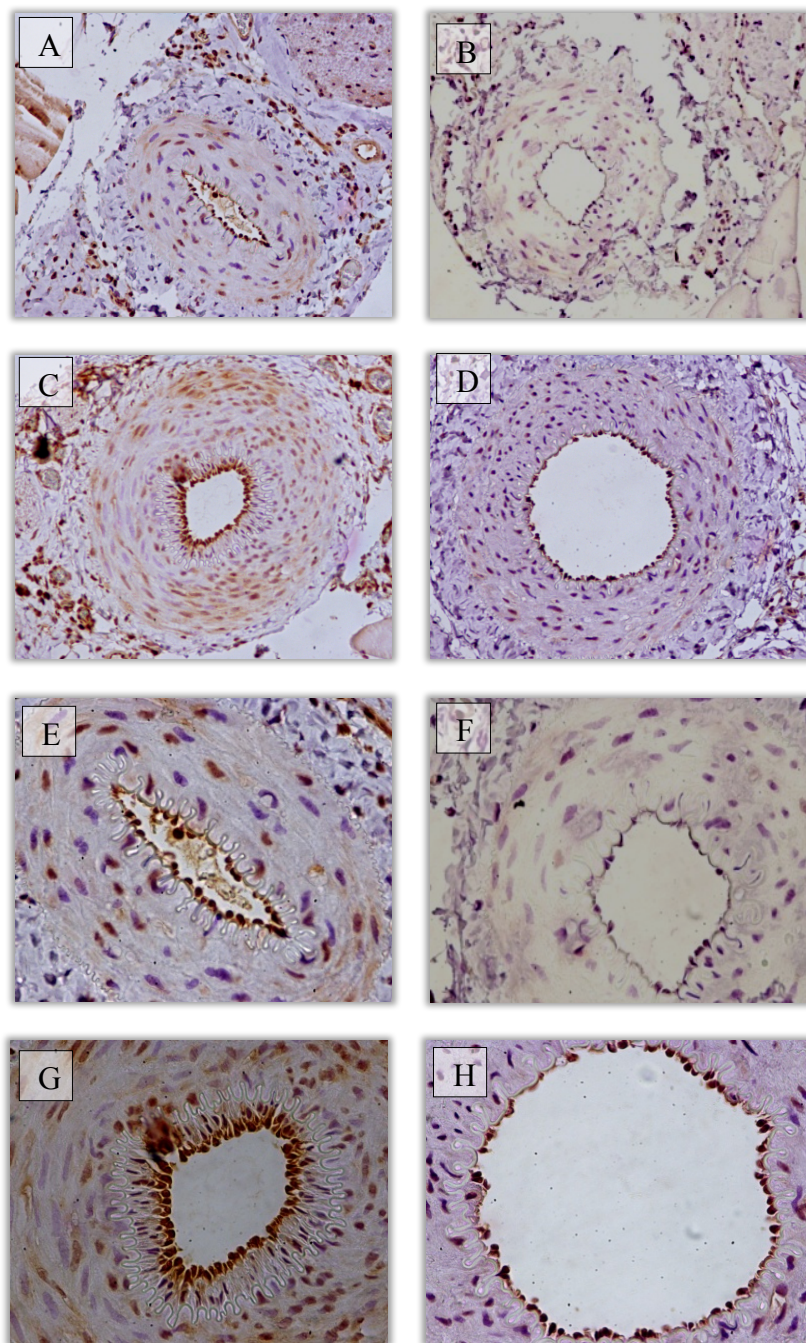


Figura 15. Expresión de CD74 en arterias femorales de rata. Se aprecia una expresión de CD74 constitutiva en la pared arterial de las arterias no dañadas especialmente en el grupo control (A, E). Dicha expresión disminuyó en las ratas que recibieron el tratamiento con paricalcitol (B, F). La expresión de CD74 aumenta significativamente en las arterias lesionadas, tanto en la capa media (C) como en el endotelio (G). El tratamiento con paricalcitol en arterias lesionadas, reduce la expresión de CD74 a niveles basales (D, H).

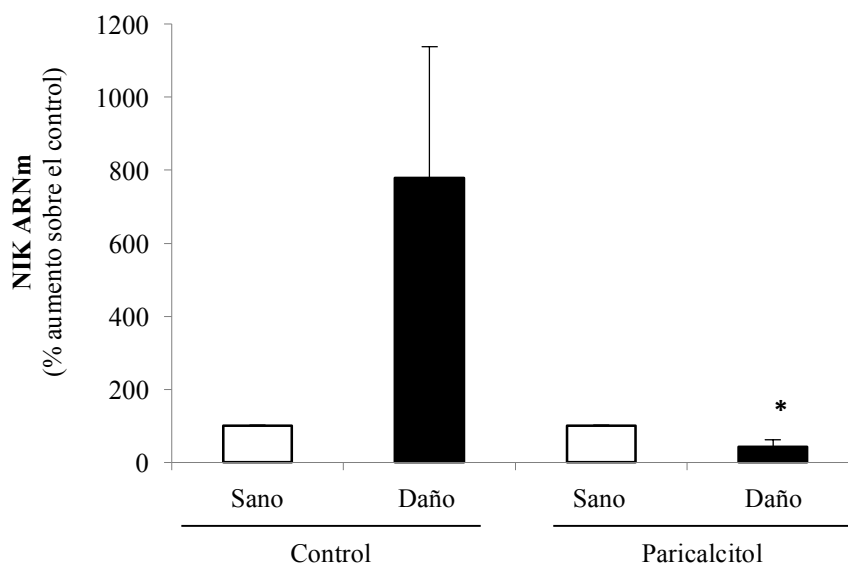


Figura 16. Durante el daño vascular aumenta la expresión de mRNA de NIK y paricalcitol lo evita. La expresión de mRNA de NIK en la arteria se estudió por RT-PCR. Datos expresados como % de aumento sobre la arteria control contralateral. (**p<0,05 vs Daño Control).

A continuación, estudiamos la expresión y localización de la proteína NIK mediante inmunohistoquímica en las muestras arteriales de los distintos grupos. La proteína se expresaba de forma constitutiva en las arterias no lesionadas, apreciándose una tinción difusa localizada en la capa media. Las arterias lesionadas presentaban un aumento significativo de la expresión de NIK tanto en el endotelio como en la capa media de la arteria. El tratamiento con paricalcitol disminuyó la expresión de NIK tanto en las arterias sanas, donde prácticamente no se observaba expresión de la proteína NIK, como en arterias dañadas, en las que la expresión de NIK disminuyó significativamente en el endotelio y en la capa media (figura 17).

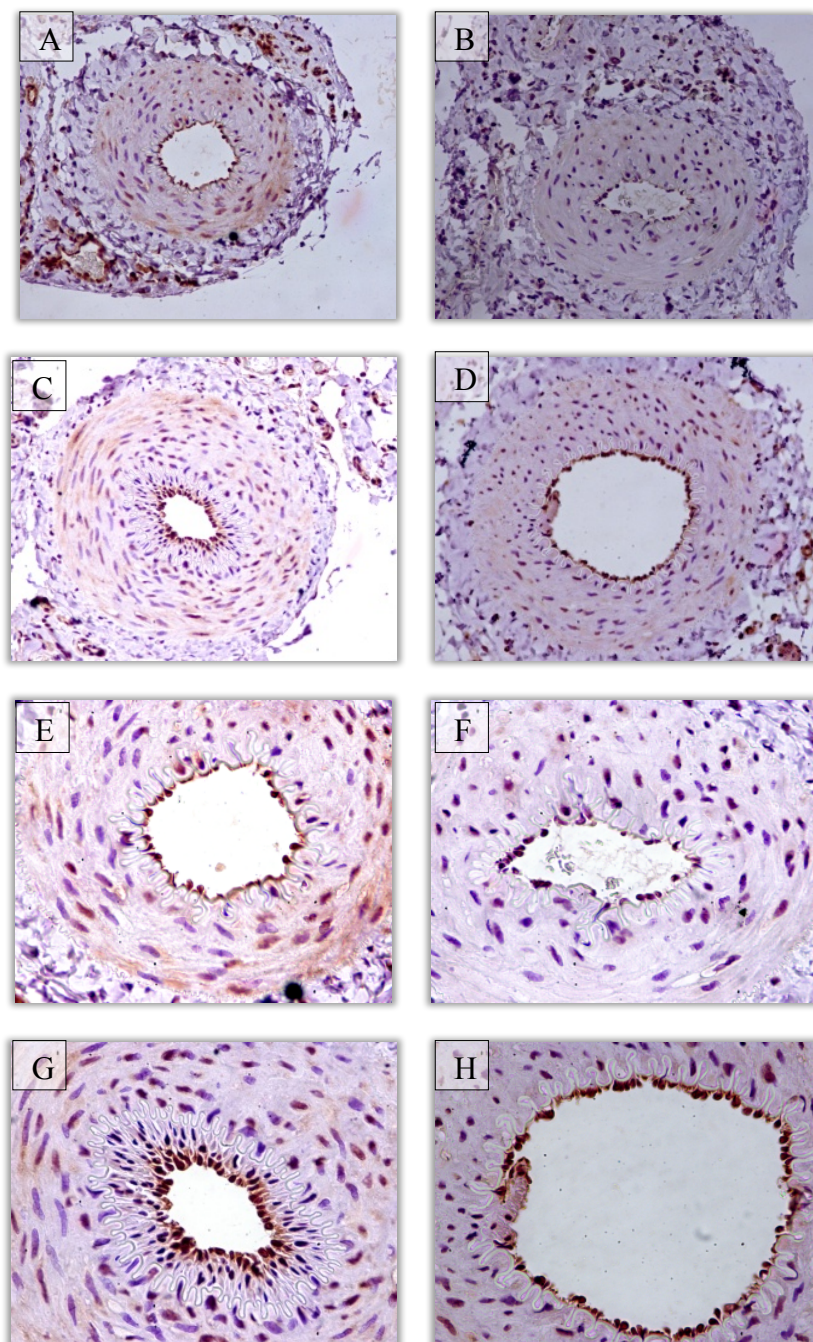


Figura 17. Expresión de NIK en arterias femorales de rata. Se aprecia una expresión constitutiva en la pared arterial de las arterias no dañadas (A). En las arterias sanas que recibieron paricalcitol (B) la expresión disminuye en todas las capas de la arteria. Las arterias dañadas con desarrollo de hiperplasia intimal (C) expresan NIK en endotelio y capa media. Esta expresión nuevamente disminuye cuando se administra paricalcitol (D). Las mismas imágenes ampliadas a (x40) corresponden a las figuras E, F, G y H.

1.2.4. Durante la hiperplasia intimal secundaria al daño endotelial en ratas, el paricalcitol disminuye la expresión de MCP1

MCP1 es una quimioquina bien caracterizada desde el punto de vista de su función en la lesión tisular in vivo y ampliamente estudiada por nuestro grupo. En la arteria dañada de ratas control se observó un aumento de la expresión de MCP-1 a nivel de mRNA con respecto a la arteria sin daño del mismo grupo. El tratamiento con paricalcitol disminuyó la expresión de MCP-1 (figura 18).

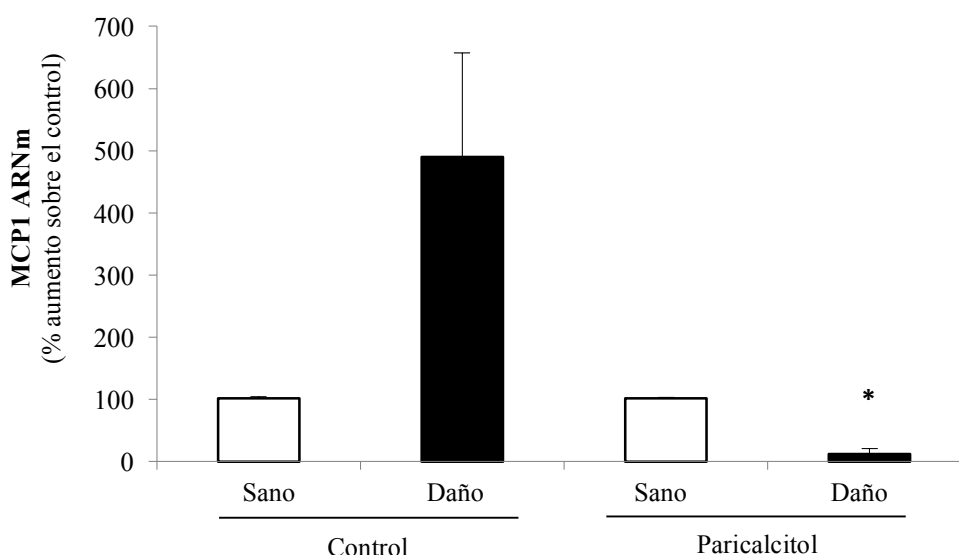


Figura 18. Durante el daño vascular aumenta la expresión de mRNA de MCP-1 y paricalcitol lo evita. La expresión de mRNA de MCP1 en la arteria se estudió por RT-PCR. Datos expresados como % de cambio sobre la arteria control contralateral. (* $p < 0,01$ vs Daño Control).

1.2.5. Durante la lesión arterial secundaria al daño endotelial en ratas, el paricalcitol disminuye la inflamación

En la arteria dañada de ratas control se observó un aumento del número de leucocitos representado por un aumento de la expresión de la proteína CD43 que se localizó principalmente en la capa adventicial. El tratamiento con paricalcitol disminuyó el infiltrado de leucocitos (figura 19).

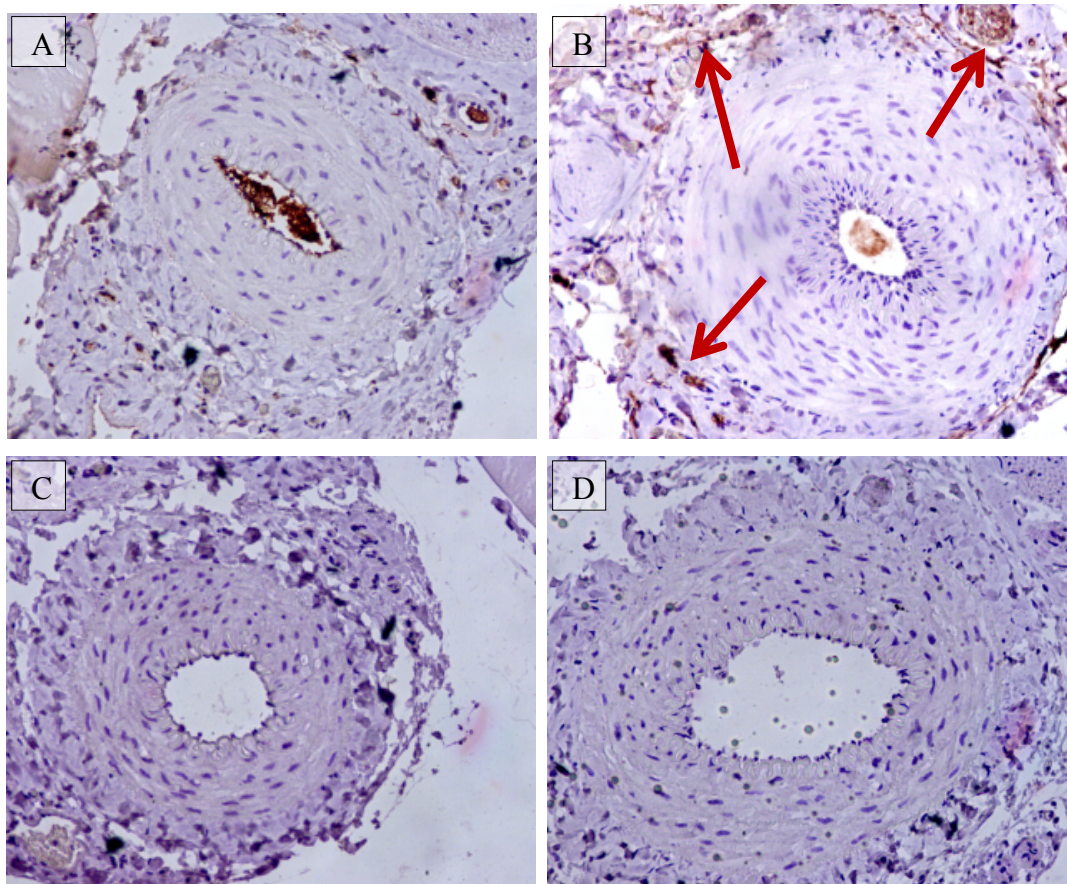


Figura 19. Expresión de proteína CD43 en arterias femorales de rata (x20). La tinción con CD43 presentaba artefactos en la luz de arterias sanas (A) y dañadas (B). Se apreciaba sin embargo un infiltrado adventicial más marcado en las arterias dañadas (flecha) que traducen un aumento de leucocitos. Este infiltrado disminuye tras la administración de paricalcitol tanto en las arterias sanas (C) como en las dañadas (D).

1.3. Resumen del daño endotelial en ratas

En definitiva, en el modelo de rata observamos que existe aumento de la expresión de distintos factores implicados en daño vascular, como el factor de crecimiento GDF15, el receptor de citoquinas CD74, la quinasa NIK y la quimioquina MCP1, y que esto se asoció a un infiltrado de leucocitos, o sea, a inflamación local. El paricalcitol disminuyó esta respuesta y mejoró el daño.

A continuación, decidimos explorar el papel de NIK en la lesión vascular ya que, al ser una quinasa, se presta mejor al diseño de pequeñas moléculas de interés terapéutico. Para

ello aprovechamos la existencia de ratones deficientes en NIK ($\text{NIK}^{\text{aly/aly}}$) que tienen una mutación puntual que inactiva NIK. Esto es, son funcionalmente deficientes en NIK.

2. Daño endotelial en ratón: La quinasa NIK promueve la estenosis arterial causada por la lesión endotelial

A fin de caracterizar el papel de NIK durante la lesión endotelial, se estudiaron arterias femorales de ratones Wild Type como grupo control ($\text{NIK}^{+/+}$), ratones heterocigotos deficientes en NIK ($\text{NIK}^{+/aly}$) y ratones homocigotos deficientes en NIK ($\text{NIK}^{\text{aly/aly}}$). Debido al escaso tamaño de la muestra que se obtenía de cada femoral de ratón, se destinaron por separado unos ratones para el estudio de mRNA y otros al estudio morfométrico y de IH.

2.1. La deficiencia de NIK protegió de la estenosis arterial

Establecimos 6 grupos de muestras arteriales procedentes de 3 grupos de ratones:

- Dos grupos de muestras obtenidas de ratones Wild Type, como grupo control ($\text{NIK}^{+/+}$),
 - Arterias control sin daño (n=4)
 - Arterias control con daño (n=4)
- Dos grupos de muestras obtenidas de ratones heterocigotos deficientes en NIK ($\text{NIK}^{+/aly}$).
 - Arterias $\text{NIK}^{+/aly}$ sin daño (n=4)
 - Arterias $\text{NIK}^{+/aly}$ con daño (n=4)
- Dos grupos de muestras obtenidas de ratones homocigotos deficientes en NIK ($\text{NIK}^{\text{aly/aly}}$).
 - Arterias $\text{NIK}^{\text{aly/aly}}$ sin daño (n=6)
 - Arterias $\text{NIK}^{\text{aly/aly}}$ con daño (n=6)

2.1.1. Hallazgos Histológicos

Se estudiaron muestras arteriales teñidas con Hematoxilina-Eosina de los diferentes segmentos arteriales de todos los grupos.

Los grupos de arterias sanas u operadas simuladamente, tenían un aspecto normal en el 100% de los casos.

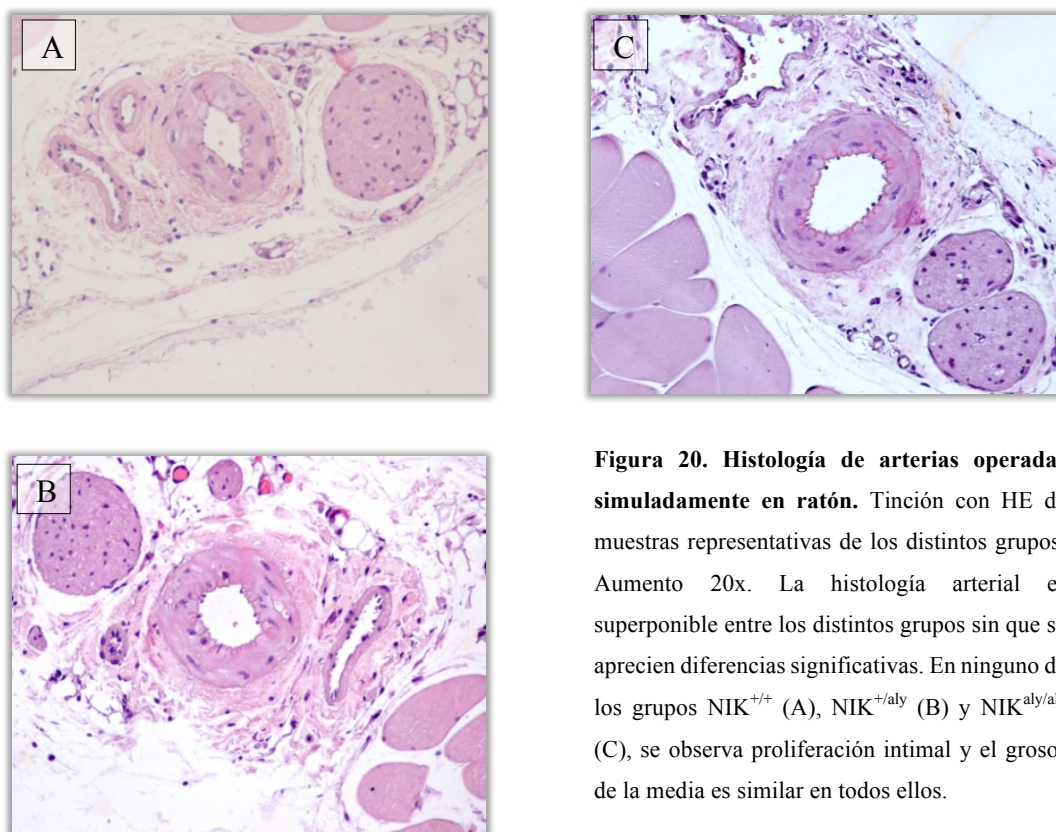


Figura 20. Histología de arterias operadas simuladamente en ratón. Tinción con HE de muestras representativas de los distintos grupos. Aumento 20x. La histología arterial es superponible entre los distintos grupos sin que se aprecien diferencias significativas. En ninguno de los grupos $NIK^{+/+}$ (A), $NIK^{+/aly}$ (B) y $NIK^{aly/aly}$ (C), se observa proliferación intimal y el grosor de la media es similar en todos ellos.

En todas las muestras el endotelio estaba intacto sin evidencia de trombo, daño en la pared arterial o engrosamiento de la íntima. Ninguna de las muestras histológicas de estos grupos presentaba lesiones proliferativas de ningún tipo en la íntima. La capa media no presentaba indicios de proliferación celular y el aspecto de la misma era bastante homogéneo entre las distintas muestras de los tres grupos. No se observó alteración de la

lámina elástica externa en ningún grupo. En definitiva, no hubo diferencias histológicas apreciables entre las arterias sanas de los ratones $NIK^{+/+}$, $NIK^{+/aly}$, y $NIK^{aly/aly}$ (figura 20).

En los grupos de arterias a las que se les realizó denudación endotelial con guía vascular, esto es, con daño u operadas, se encontraron signos histológicos de hiperplasia intimal en diferentes grados. En todos los especímenes se encontró algún indicio de lesión en al menos una muestra de los diferentes segmentos arteriales estudiados. El grado de hiperplasia intimal en cada segmento arterial, al igual que en el modelo de rata, dependía tanto del calibre de la arteria como de la eficacia del raspado en ese punto. A nivel histológico, las diferencias más llamativas entre los ratones wild type (WT) y los ratones deficientes en NIK, se encontraban principalmente en el grado de proliferación intimal en la luz del vaso y en el número de leucocitos que circundaban la arteria a nivel adventicial y en la media. No se observó alteración de la lámina elástica externa en ningún grupo (figura 21).

2.1.2. Análisis Morfométrico

Todas las muestras arteriales fueron válidas para realizar el análisis morfométrico y proceder al estudio estadístico descriptivo.

Las arterias con cirugía simulada, al no presentar lesiones proliferativas de ningún tipo, tenían una relación íntima/media (I/M) igual a cero. No hubo diferencias significativas en el área total del vaso ni en el área de la media entre las muestras de arterias simuladamente operadas de los diferentes grupos.

Con respecto a los grupos en los que se realizó denudación endotelial, la hiperplasia intimal, definida como cualquier lesión proliferativa dentro de la circunferencia de la lámina elástica interna, se produjo en diferentes grados en las diferentes muestras (Tabla 3). El área media de la íntima, a las 2 semanas de intervención, era 1033244 ± 1231376 pixels² en el grupo control WT, 516049 ± 320050 pixels² en el grupo de ratones heterocigotos, y 342657 ± 222935 pixels² en el grupo de ratones homocigotos deficientes en NIK. Esta medida se tradujo en una relación I/M de $0,93 \pm 1,07$; $0,51 \pm 0,29$ y $0,32 \pm$

0,24; y un porcentaje de estrechamiento luminal de $92,01 \pm 1,48 \%$; $60,38 \pm 16,73 \%$ y $34,33 \pm 11,46 \%$ respectivamente.

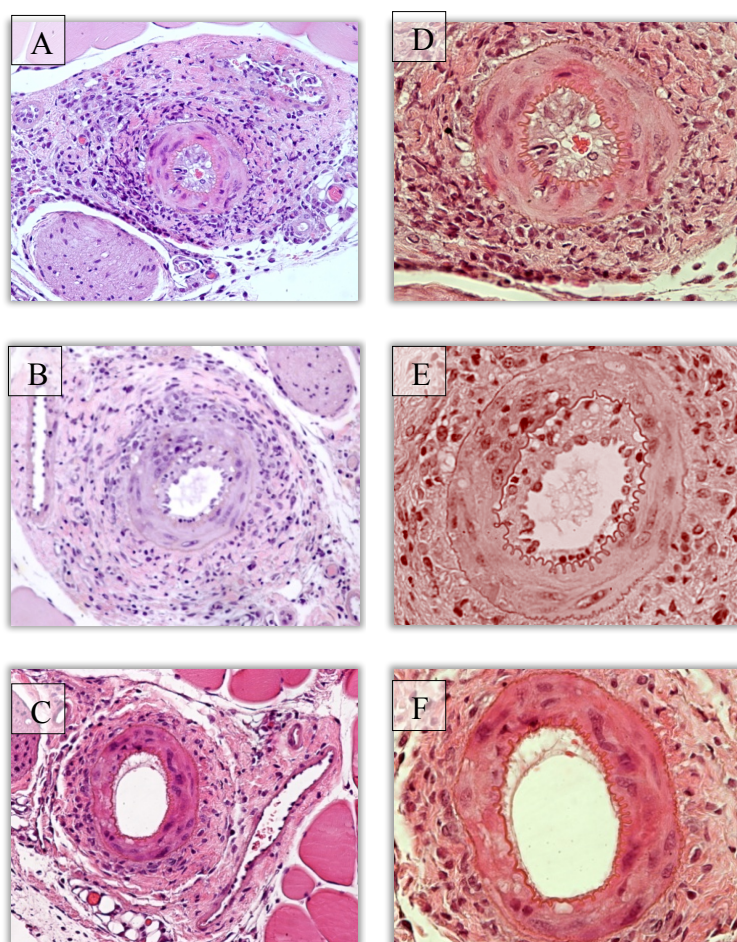


Figura 21. Histología de arterias dañadas en ratón. Tinción con HE de muestras representativas de los distintos grupos con aumentos a 20x (A, B, C). Se aprecia infiltración leucocitaria con marcado aumento de la celularidad concentrada a nivel periadventicial en los ratones WT $NIK^{+/+}$ (A), que disminuye en los ratones heterocigotos ($NIK^{+/aly}$) (B) y aún más en los homocigotos deficientes en NIK ($NIK^{aly/aly}$) (C); asimismo, se observa una disminución progresiva del grado de hiperplasia en la capa intimal con el consecuente aumento de la luz del vaso entre los distintos grupos. Las mismas muestras se representan con aumentos a 40x (D, E, F).

Como se puede observar, según las medidas de dispersión, la distribución de los datos resultó ser bastante asimétrica especialmente en el grupo de ratones WT y principalmente en lo referente a los valores de la I/M ratio. Esto es atribuible a los resultados obtenidos en una de las muestras de los ratones, en la que, sin llegar a presentar signos excluyentes para el estudio, se observaba un diámetro arterial total muy por encima de la media, principalmente a expensas del área intimal. La túnica media, aunque circunferencialmente era mayor que en el resto de las muestras, no presentaba un aumento de área porque

quedaba comprimida en las capas más externas. Entendemos que una explicación a este suceso podría ser el proceso de preparación de la muestra o incluso una retirada excesiva de la capa adventicial que rodea al paquete vascular durante el momento de la intervención quirúrgica. Esta muestra podría haber alterado los resultados de la estadística inferencial que exponemos más adelante.

Tabla 3. Histomorfometría del daño arterial en ratón. Áreas medidas en pixels², con aumento de microscopio de (x20), expresadas como la media \pm DS de las medias de los especímenes de cada grupo.

	WT (NIK $+/+$)		Heterozigoto (NIK $+/-$)		Homozigoto (NIK aly/aly)	
	Control	Daño	Control	Daño	Control	Daño
n	4	4	4	4	6	6
Área del vaso	694884 \pm 194383	2048506 \pm 1551630	881080 \pm 122361	1815844 \pm 703422	1127371 \pm 255838	2291506 \pm 344074
Área de la media	577270 \pm 155400	935207 \pm 298592	711965 \pm 79853	948873 \pm 219401	806586 \pm 102317	1276617 \pm 239666
Área de la íntima	0 \pm 0	1033244 \pm 1231376	0 \pm 0	516049 \pm 320050	0 \pm 0	342657 \pm 222935
Área de la luz	117613 \pm 48769	80055 \pm 120925	169115 \pm 46040	350922 \pm 238579	320785 \pm 160274	672233 \pm 214039
I/M ratio	0 \pm 0	0,93 \pm 1,07	0 \pm 0	0,51 \pm 0,29	0 \pm 0	0,32 \pm 0,24
%estenosis	0 \pm 0	92,01 \pm 1,48	0 \pm 0	60,38 \pm 16,73	0 \pm 0	34,33 \pm 11,46

En líneas generales, los ratones deficientes en NIK (NIK^{aly/aly}) tuvieron menor ratio I/M y significativamente menor % de estenosis. La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, reflejaba que existían diferencias estadísticas para las variables *área de la luz* y *% de estenosis*. Estas pruebas indicaban que existían diferencias al menos entre dos de los grupos. Para conocer entre qué grupos había diferencias, se realizaron comparaciones dos a dos con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. El área de la luz arterial resultó ser significativamente menor en los grupos de ratones WT y heterozigotos NIK^{+/-} con respecto a los ratones homozigotos NIK^{aly/aly}.

Por otra parte, se encontró una disminución progresiva y estadísticamente significativa, en el % de estenosis entre los tres grupos (Tabla 4).

Tabla 4. Comparaciones entre grupos de ratones con daño.

	WT (NIK+/+)	Heterozigoto (NIK+/aly)	Homozigoto (NIK ^{aly} /aly)	P
Área del vaso	2048506 ± 1551630	1815844 ± 703422	2291506 ± 344074	0,43
Área de la media	935207 ± 298592	948873 ± 219401	1276617 ± 239666	0,12
Área de la íntima	1033244 ± 1231376	516049 ± 320050	342657 ± 222935	0,36
Área de la luz	80055 ± 120925	350922 ± 238579**	672233 ± 214039*	0,007
I/M ratio	0,93 ± 1,07	0,51 ± 0,29	0,32 ± 0,24	0,19
%estenosis	92,01 ± 1,48	60,38 ± 16,73***	34,33 ± 11,46*	0,006

* p≤0.010 vs WT; ** p=0.038 vs NIK^{aly/aly} ; *** p<0.05 vs WT y vs NIK^{aly/aly}

Las figuras 22 y 23 presentan los principales resultados de forma gráfica:

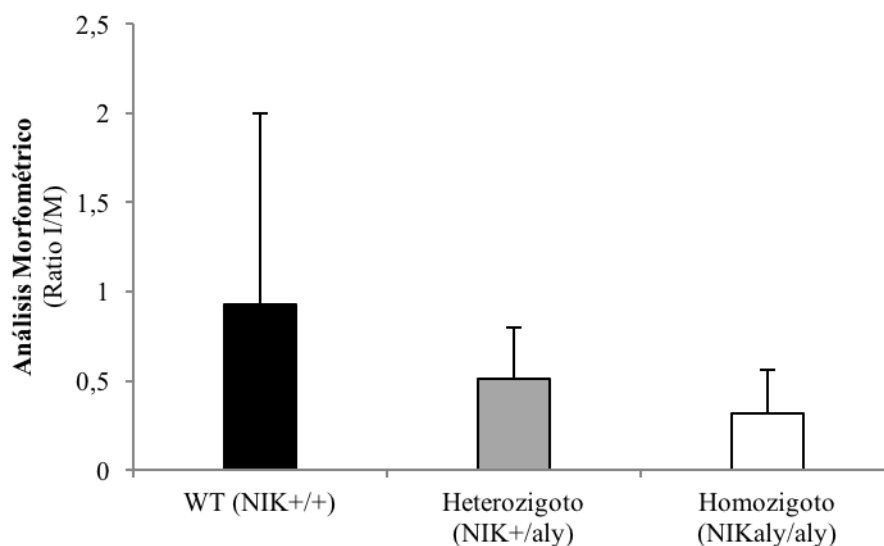


Figura 22. Relación intimo-medial entre los vasos dañados de los tres grupos de ratones. Se observa una disminución progresiva del ratio I/M en los tres grupos en relación con la ausencia de expresión de NIK. Esta tendencia se aproximaba a la significación estadística (p=0,19)

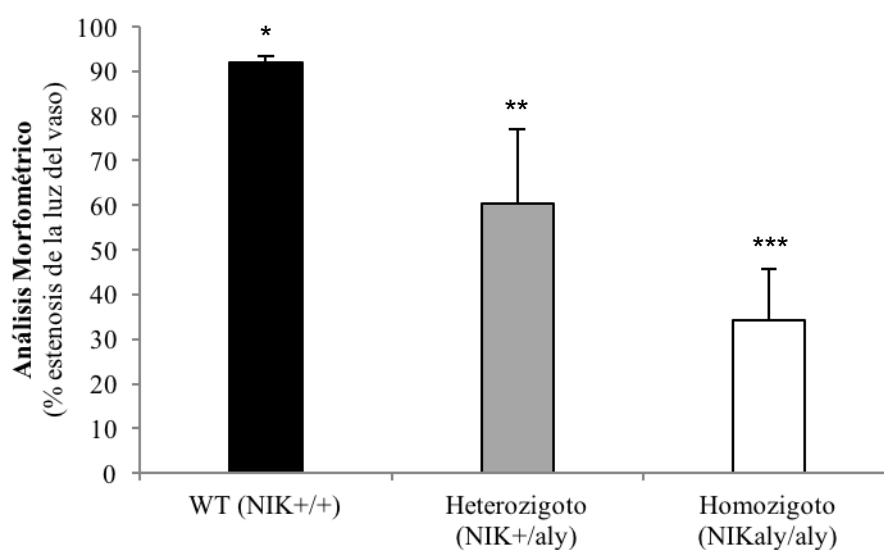


Figura 23. Porcentaje de estenosis en la luz de los vasos dañados de los tres grupos de ratones. Se obtuvo una disminución progresiva del porcentaje de estenosis entre los diferentes grupos que resultó estadísticamente significativa ($p=0,006$). En el estudio de los grupos dos a dos se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos $NIK^{+/+}$ y $NIK^{+/aly}$ (* $p=0,029$); entre los grupos $NIK^{+/aly}$ y $NIK^{aly/aly}$ (** $p=0,039$); y entre los grupos $NIK^{aly/aly}$ y $NIK^{+/+}$ (***) $p=0,009$).

Según se ha detallado anteriormente, los resultados de una de las muestras del grupo WT, alteraron las medias de las medidas analizadas, especialmente el ratio I/M, que presentaba una DS muy amplia. Sin embargo, aunque no se alcanzó una diferencia estadísticamente significativa, los resultados obtenidos guardaban una cierta coherencia.

2.2. Expresión génica en la lesión arterial del ratón: impacto de la deficiencia de NIK

Para el estudiar la expresión de mRNA, establecimos 4 grupos de muestras arteriales procedentes de 2 grupos de ratones:

- Dos grupos de muestras obtenidos de ratones Wild Type, como grupo control ($NIK^{+/+}$),
 - Arterias control sin daño ($n=5$)
 - Arterias control con daño ($n=5$)

- Dos grupos de muestras obtenidos de ratones homocigotos deficientes en NIK ($\text{NIK}^{\text{aly/aly}}$).
 - Arterias $\text{NIK}^{\text{aly/aly}}$ sin daño (n=5)
 - Arterias $\text{NIK}^{\text{aly/aly}}$ con daño (n=5)

En las arterias dañadas de los ratones WT se observó un aumento de MCP1 a nivel de mRNA, al compararlo con las arterias sanas de ese mismo grupo. Este aumento de la expresión de MCP1 fue estadísticamente significativo ($p < 0,02$). Las arterias dañadas de los ratones deficientes en NIK mostraban una disminución de la expresión de MCP1 a nivel de mRNA que no llegó a ser estadísticamente significativa (figura 24).

Asimismo, los niveles de MCP-1 circulante, evidencia de inflamación sistémica, se determinaron mediante ELISA. Estos niveles fueron más bajos en ratones deficientes en NIK que en ratones WT ($*p < 0,05$) (figura 25).

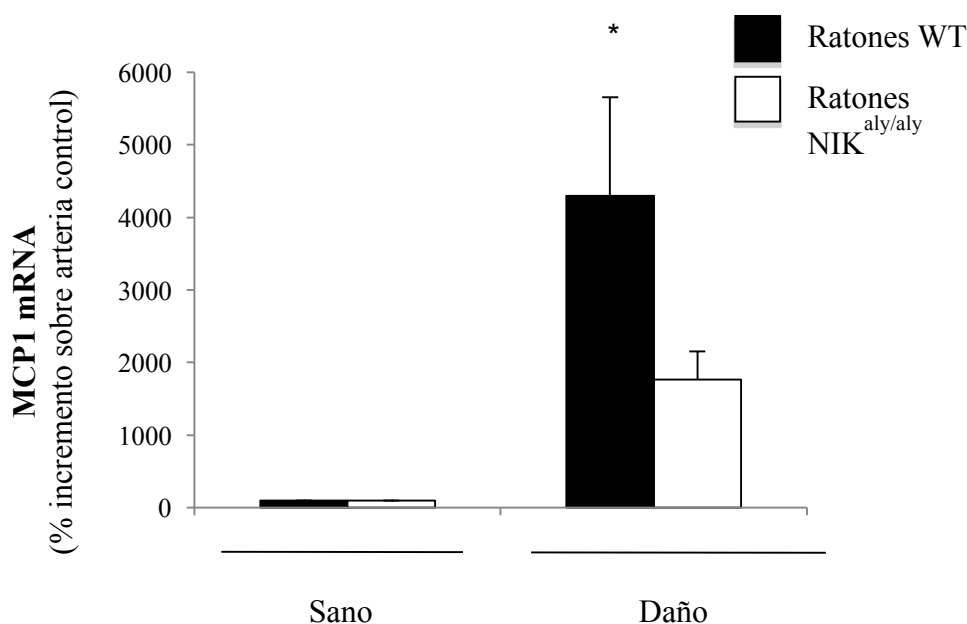


Figura 24. Expresión de mRNA de MCP-1 en el daño vascular. La expresión de mRNA de MCP1 en la arteria se estudió por RT-PCR. MCP1 aumenta en las arterias dañadas con respecto a las arterias sanas de los ratones WT ($*p < 0,02$). La expresión de mRNA disminuía de forma no significativa en los ratones $\text{NIK}^{\text{aly/aly}}$ frente a los ratones WT. Datos expresados como % de aumento sobre la arteria control contralateral

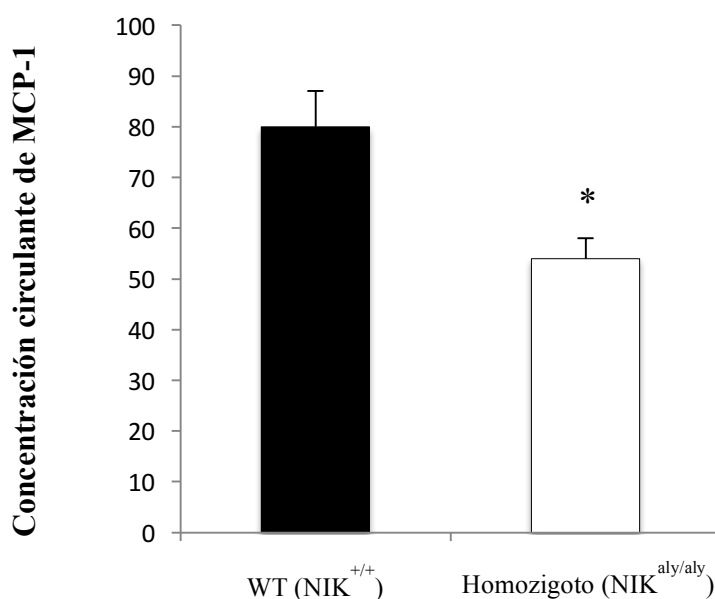


Figura 25. Los niveles circulantes de MCP1 (pg/ml) disminuyen en ratones deficientes en NIK. Valores expresados como la concentración de MCP1 en 100µl de plasma de ratón. Se observaba una disminución en el grupo de ratones deficientes en NIK (NIK^{aly/aly}) frente a los ratones WT (*p<0,05)

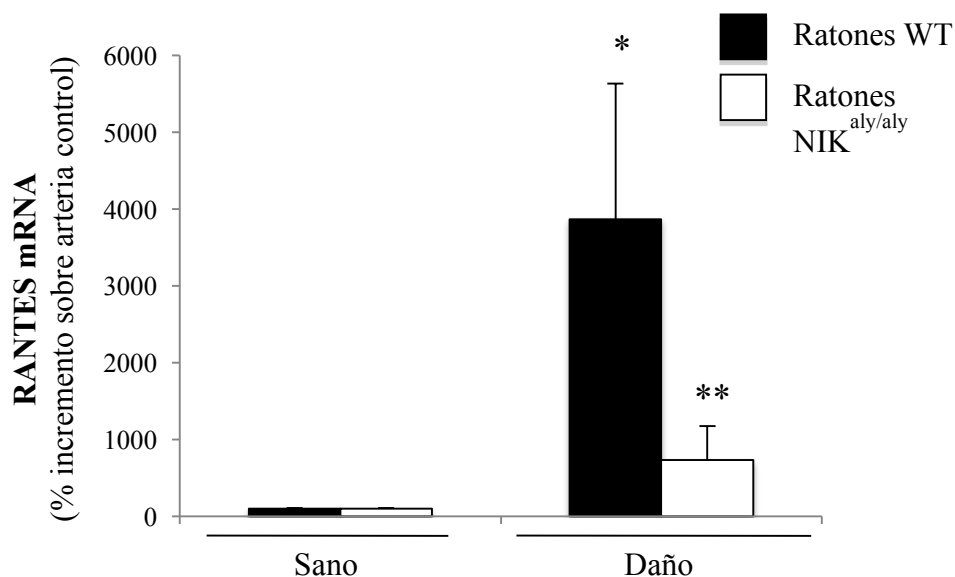


Figura 26. Expresión de mRNA de RANTES en el daño vascular. La expresión de mRNA de RANTES en la arteria se estudió por RT-PCR. RANTES aumenta en las arterias dañadas con respecto a las arterias sanas de los ratones WT (*p<0,014). La expresión de RANTES disminuyó en las arterias dañadas de los ratones deficientes en NIK frente a los ratones WT (**p<0,03). Datos expresados como % de aumento sobre la arteria control contralateral.

En las arterias dañadas de los ratones WT también se observó un aumento del mRNA que codifica la quimioquina RANTES, frente a las arterias sanas de ese mismo grupo con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.014$). Las arterias dañadas de los ratones deficientes en NIK también mostraban una disminución de la expresión de mRNA de RANTES con respecto a las arterias dañadas de los ratones WT con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.03$) (figura 26).

2.3. En los ratones $NIK^{aly/aly}$ está disminuida la inflamación secundaria al daño endotelial.

En las arterias dañadas se observó un aumento del número de leucocitos representado por un aumento de la expresión de la proteína F4/80 que se localizó tanto en la capa de proliferación intimal, como en la capa media y los tejidos circundantes. Los ratones deficientes en NIK presentaban una menor infiltración por leucocitos (figura 27).

2.4. Conclusión del modelo de ratón

La lesión arterial se caracterizó por estenosis arterial, aumento de las quimioquinas MCP1 y RANTES en la pared arterial, inflamación sistémica e infiltrados leucocitarios arteriales. Los ratones deficientes en la quinasa proinflamatoria NIK quedaron protegidos de la estenosis arterial causada por lesión endotelial. El mecanismo de este efecto protector podría ser una disminución de la respuesta inflamatoria, puesto que los ratones deficientes en NIK presentaron menor expresión de mRNA de quimioquinas, así como de MCP1 circulante y un menor infiltrado por macrófagos.

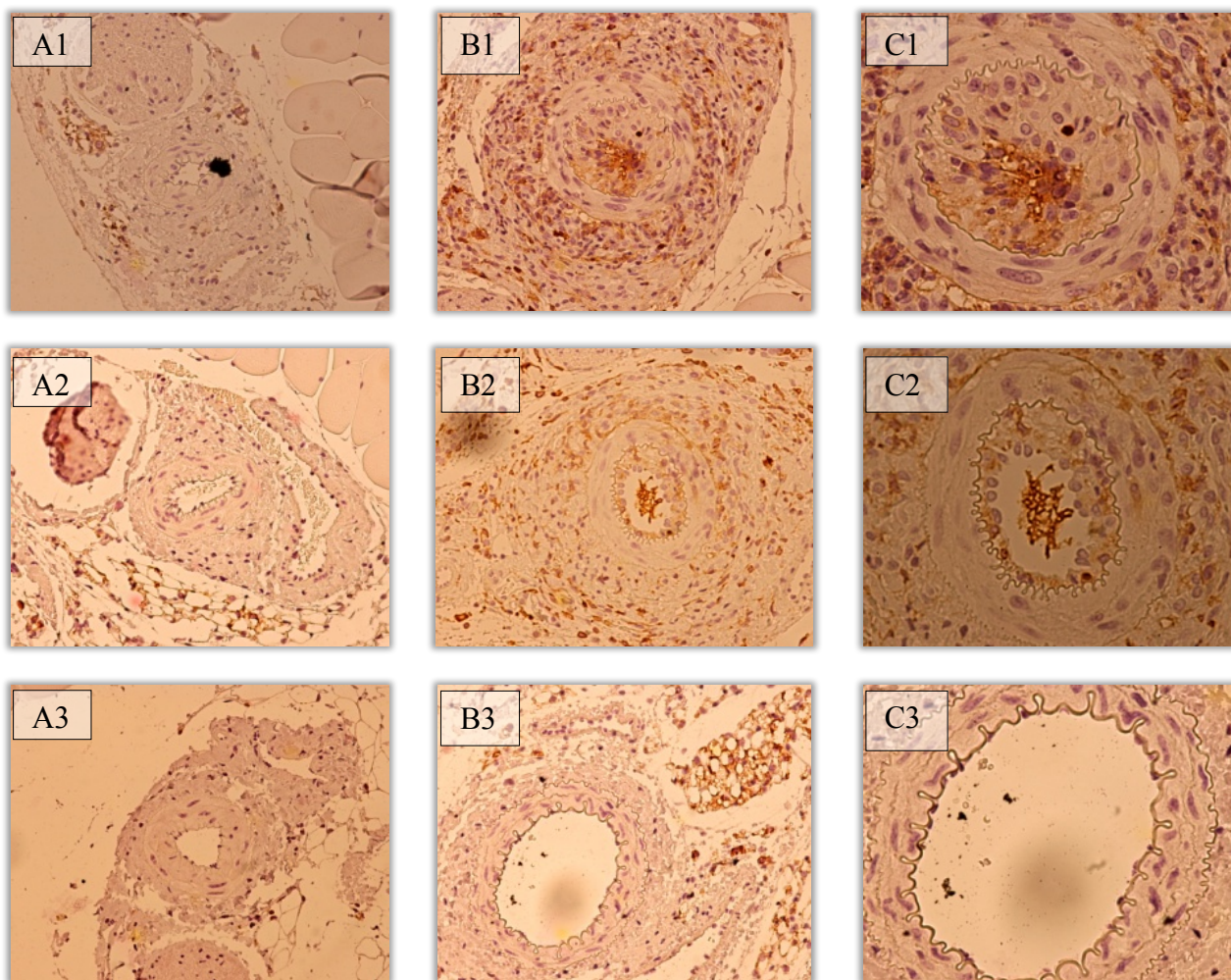


Figura 27. Expresión de F4/80 en arterias femorales de ratón. A1, A2 y A3 son cortes representativos de las arterias sanas de los ratones WT, heterocigotos ($\text{NIK}^{+/aly}$) y ratones deficientes en NIK ($\text{NIK}^{aly/aly}$) respectivamente. No se aprecia infiltración leucocitaria en ninguna capa. B1, B2 y B3 son cortes representativos (aumento 20x) de las arterias que sufrieron daño de cada grupo. La infiltración leucocitaria era más marcada en el grupo WT y disminuía progresivamente en los grupos $\text{NIK}^{+/aly}$ y $\text{NIK}^{aly/aly}$. Se aprecia que la densidad de leucocitos disminuye progresivamente a nivel periadventicial. También se aprecia una reducción progresiva de la hiperplasia intimal que prácticamente llega a desaparecer en el grupo de ratones deficientes en NIK ($\text{NIK}^{aly/aly}$). C1, C2 y C3 son los mismos cortes arteriales con aumentos a 40x.

VI. DISCUSIÓN

“El objeto de toda discusión

no debe ser el triunfo,

sino el progreso”

Joseph Antoine René Joubert

La hiperplasia intimal es el proceso patológico que subyace a la reestenosis arterial después de producirse el daño endotelial, y se desarrolla en gran parte como resultado de la proliferación y migración de las células del músculo liso vascular (VSMC) ^{109,110}. Supone la principal causa de fallo de los injertos vasculares a medio plazo ^{111–113}. Los principales resultados de esta tesis muestran que paricalcitol disminuye la expresión de genes que codifican para factores potencialmente implicados en el daño vascular y que esto se traduce en una disminución de la inflamación local. En concreto, nuestros estudios funcionales in vivo sugieren que la menor expresión de uno de estos factores, NIK, la quinasa apical de la vía no canónica de activación del factor de transcripción proinflamatorio NFκB, podría contribuir a la protección ofrecida por paricalcitol y podría ser una nueva diana terapéutica en la lesión vascular.

1. Modelo Experimental

Existe un gran número de ensayos clínicos con diversos enfoques terapéuticos destinados a prevenir o retrasar hiperplasia intimal. A pesar de su efectividad en experimentos con animales, su utilidad clínica suele ser escasa ^{114–116}.

En el modelo de denudación endotelial, como respuesta al daño causado en la pared arterial, se produce la liberación de factores de crecimiento y otros factores biológicamente activos, que cambian la composición de la matriz extracelular y promueven el cambio fenotípico de las células del músculo liso vascular, de contráctil a sintético, lo que lleva a la proliferación celular en la capa media y la migración a la capa íntima, formando la neoíntima¹¹⁷. La biología de la hiperplasia arterial en respuesta a la lesión endotelial es, como puede intuirse, un proceso complejo con implicación de un gran número de procesos moleculares determinantes, que requiere una investigación profunda sobre los mecanismos celulares fundamentales involucrados en esta respuesta, y que pudieran, eventualmente, ser dianas terapéuticas para evitar la reestenosis.

A pesar de las mejoras en las técnicas y los muchos estudios realizados, aún se desconoce el motivo por el cual, tras una angioplastia, algunas arterias desarrollan reestenosis y otras

no. Esta falta de comprensión sobre la reestenosis podría atribuirse a modelos experimentales inadecuados o a análisis incorrectos de los mismos¹¹⁸.

La denudación endotelial mediante raspado, es la técnica *gold standard* para estudiar la respuesta proliferativa de las células de musculo liso, a la lesión vascular. Sin embargo, esta técnica presenta una serie de limitaciones tanto en la técnica quirúrgica como en el procesamiento de las muestras obtenidas. Además, la respuesta es muy variable en función del modelo animal sobre el que se realice el estudio.

Al igual que en el estudio de la arteriosclerosis, no existe un modelo animal único e ideal que recree las condiciones en las que se desarrolla la hiperplasia intimal de forma exactamente igual a como ocurre en el ser humano. Sin embargo, los modelos animales, resultan necesarios para estudiar la función de genes particulares que participan en estos procesos^{119,120}. En este sentido, elegimos el modelo de lesión endotelial en rata y ratón en base a la disponibilidad en nuestro laboratorio, el coste de adquisición y la facilidad de mantenimiento y manipulación de estos animales. Asimismo, tuvimos en cuenta la facilidad para generar lesiones y el tiempo, relativamente corto, para el desarrollo de las mismas. Además, el uso de ratones *knock-out* nos permitía estudiar el papel de genes específicos en esta patología.

El grado de respuesta inflamatoria tras la denudación endotelial en modelos animales depende no solo de la gravedad y agresividad con la que se realice la lesión, sino que también puede estar influenciada por las propiedades intrínsecas de las mismas arterias (contenido en colágeno, hemodinámica de la sangre...), resultando en la formación de una neoíntima más o menos hiperplásica¹²¹. En este sentido, la respuesta al daño sería diferente si se estudia la arteria carótida o la arteria femoral, que son las dos principales en esta clase de modelos experimentales. En nuestro caso elegimos la arteria femoral porque ofrecía mejores resultados de supervivencia y permitía el abordaje bilateral, para el estudio comparativo de muestras, con mínima repercusión para los animales. La decisión de establecer un periodo postquirúrgico de 2 semanas para el desarrollo de la hiperplasia, se hizo en base a la literatura consultada¹²² y a nuestra experiencia en estudios y ensayos previos. Por otra parte, hemos considerado crucial en el estudio morfométrico de nuestras muestras, obtener como valor de referencia, no solo la zona más representativa del daño arterial, sino una media del análisis completo de todo el segmento arterial sobre el que aplicamos el daño, resultando en diferentes grados de

expresión de estenosis arterial y pudiendo obtener un resultado medio de todos los valores.

Como referencia para conocer la efectividad de nuestra técnica quirúrgica aplicada al modelo, interesaba conocer los parámetros correspondientes al porcentaje de estenosis y a la I/M ratio en las ratas control y en los ratones WT a los que se les había generado daño endotelial. Obtuvimos un porcentaje de estenosis arterial del 73% en las arterias dañadas de ratas del grupo control tratadas con vehículo. No hemos encontrado en la literatura estudios que analizaran este parámetro en modelos de daño endotelial específicamente en la arteria femoral en rata, por lo que no podíamos validarlos directamente con otros resultados, sin embargo, los estudios realizados sobre arteria carótida, muestran porcentajes similares ¹²³. En ratón wild type, este resultado fue de 0.93, algo más elevado que en la literatura consultada sobre estudios que realizan procedimientos similares ¹⁰⁰. Respecto a los valores de la ratio I/M, en ratones fueron también bastante superponibles a la literatura mencionada (0.92), sin embargo, en el modelo de rata la I/M era mucho menor (0.24). No obstante, los resultados de distintos estudios son muy variables y otros autores con Moroi reportan ratios inferiores ¹²⁴. Algunos autores señalan que a medida que transcurre el tiempo de lesión, se produce una reducción del área de la media por necrosis y apoptosis celular y por la migración continua de células de musculo liso a la neoíntima, que crece progresivamente, con lo que el ratio I/M, conceptualmente, debería tender a ser cada vez mayor de 1. En nuestras muestras de rata control y de ratón WT, sin embargo, no se aprecia una disminución de los valores absolutos del área de la media de las arterias dañadas respecto a las no operadas, incluso en grupos como las ratas tratadas con paricalcitol, el área de la media aumenta de forma significativa. No obstante, este dato es engañoso, ya que lo que sí disminuye, es el porcentaje del área de la media respecto al área total del vaso, que aumenta en todos los grupos estudiados.

La variabilidad de los resultados entre los diferentes estudios es enorme, pero en líneas generales hemos conseguido unos estándares adecuados de validez y reproducibilidad del modelo que permitían comparar los resultados de las muestras control con los resultados de las muestras a las que se les aplicaba tratamiento o presentaban alguna modificación genética.

2. Expresión local de potenciales mediadores del daño vascular

En la presente tesis, nos hemos planteado cómo los activadores del receptor de la vitamina D, en concreto el paricalcitol, podrían modular las señales de inflamación implicadas en el desarrollo de la hiperplasia intimal secundaria a la lesión endotelial. Sin embargo, en primer lugar, hemos querido identificar y conocer dichas señales en las muestras arteriales que se habían sometido a un daño frente a las que habíamos denominado sanas. Específicamente, nos hemos centrado en la identificación de mediadores de inflamación de la cascada de activación del NFκB, un factor de transcripción con potencial para regular muchos procesos, incluyendo la respuesta inflamatoria y la muerte celular.

Se sabe que NFκB está directamente implicado en el proceso inflamatorio que se desarrolla durante la hiperplasia intimal, regulando los mecanismos de apoptosis celular. La apoptosis es un mecanismo celular patogénico que se produce en una amplia variedad de enfermedades, incluyendo, por supuesto, los trastornos vasculares. La apoptosis de las VSMC se desarrolla de forma crítica tanto en la progresión e inestabilidad de las placas ateroscleróticas, como en la hiperplasia intimal ^{125,126}. Tras una angioplastia, como respuesta al daño, se produce una proliferación de VSMC, en parte controlada por un proceso apoptótico que regula la remodelación del vaso lesionado ¹²⁷⁻¹²⁹. Aunque se conoce poco sobre los mecanismos que regulan las vías apoptóticas en las VSMC, se sabe que el NFκB desarrolla un papel crucial ^{130,131}, y se ha demostrado, en modelos animales, que su inhibición, mediante terapias moleculares, reduce significativamente el desarrollo de hiperplasia intimal tras producirse una lesión endotelial, tanto por inducción de apoptosis celular como por disminución de la expresión de moléculas de adhesión ¹³²⁻¹³⁴.

La respuesta transcripcional del NFκB no es uniforme ante una agresión endotelial, habiéndose comprobado diferencias en la expresión de proteínas de adhesión en función de si se trata de un daño endotelial aplicado mecánicamente o una inflamación aterosclerótica inducida por la dieta ¹³⁵. Asimismo, se ha comprobado que la respuesta de activación de NFκB también varía en función de la localización anatómica del árbol vascular sobre la que se produzca la lesión, siendo crucial el ambiente hemodinámico al que se vea sometido el endotelio. Dicho ambiente determina tanto la morfología celular como los niveles de expresión de los componentes de NFκB en el endotelio ¹³⁶, y todo

ello se traducirá en un mayor o menor desarrollo de hiperplasia intimal en cada territorio vascular.

Nuestros resultados muestran, bastante concordancia con respecto a las publicaciones consultadas y que estudian la respuesta endotelial al daño vascular y su relación con la activación del sistema NFκB en modelos animales ^{137,138}. Como indicábamos anteriormente, NFκB es un factor de transcripción que regula a la baja los procesos de apoptosis celular por lo que se le ha implicado en el desarrollo de tumorigénesis y patologías de tipo inflamatorio y proliferativo. En nuestro caso hemos analizado su implicación en la hiperplasia intimal estudiando indirectamente la expresión de una serie de factores como GDF15, un factor de crecimiento cuya expresión está regulada por NFκB, como ya señalan autores como Ratnam ⁶³. GDF15 o MIC-1 es una proteína que pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) y que parece tener cierto papel en la regulación de las vías inflamatorias con funciones antiapoptóticas y pro-proliferativas. Si se sobreexpresara, aumentaría por ejemplo el riesgo de desarrollar cáncer. También se ha estudiado la expresión de CD74, que funciona como un receptor de “supervivencia” y del que se ha demostrado su relación con NFκB, en trabajos como el de Starlets ¹³⁹, regulando la diferenciación de células B mediante la inducción de una ruta que conduce a la activación de la transcripción mediada por la vía canónica (p65/RelA). Se sabe que CD74 regula la expresión de MCP-1 a través de NFκB, hecho que se ha demostrado en estudios sobre patología inflamatoria como la aterosclerótica ⁴⁸. En patologías tumorales, se ha visto que esta regulación puede estar modulada por catepsina S ¹⁴⁰, lo que permite abrir nuevas posibilidades de tratamiento. Asimismo se ha analizado la expresión de la quimioquina MCP1, cuya transcripción genética está mediada por NFκB ¹⁴¹. Nuestros resultados han demostrado, en líneas generales, bastante concordancia con la literatura publicada, encontrando un aumento en la expresión tanto del factor de crecimiento GDF15, como del receptor CD74, como de MCP1 en las arterias dañadas frente a las no dañadas. Podemos concluir, en base a estos hallazgos, que durante el proceso de hiperplasia intimal en respuesta a la lesión endotelial, en el modelo experimental de rata, se produce una activación del sistema NFκB que regularía dicha respuesta.

3. NIK y el daño vascular

La activación de NFκB no canónica, como ya hemos dicho, es una respuesta retardada a un número limitado de estímulos, e implica la activación de la enzima apical de la vía de activación no canónica de NFκB (NIK). A diferencia de la vía canónica, solo se conocen un número limitado de estímulos que activan la vía NFκB no canónica. Estos incluyen productos finales de glicosilación avanzada y miembros de la superfamilia del receptor de TNF tales como el receptor de linfotoxina-β, el factor de activación de células B, CD40, CD27 y el receptor de TWEAK, Fn14^{142,143}. El papel de NIK, en los procesos inflamatorios, ha sido ampliamente descrito y estudiado. Nuestro grupo, en estudios previos sobre inflamación en el daño renal agudo, centró su atención en moléculas apicales de vías de señalización que, a través de su activación, regulasen la expresión coordinada de una serie de moléculas inflamatorias. Los análisis, en el daño renal agudo, indicaban un enriquecimiento de proteínas de las vías de activación no canónicas del factor de transcripción NFκB. Por un lado, los estudios funcionales identificaron que, tanto la expresión de quimioquinas como la muerte y proliferación celular, eran procesos regulados por NIK. Por otra parte, los estudios realizados en humanos con fracaso renal agudo, mostraban una sobreexpresión de NIK. Además las pruebas realizadas en ratones genéticamente modificados confirmaron el papel clave de NIK en la nefropatía aguda inducida por cisplatino¹⁰⁴.

La activación canónica de NFκB es una respuesta temprana, rápida, transitoria (dura en torno a 1-3 horas) e independiente de la síntesis de proteínas y de respuesta a un amplio rango de estímulos que involucra la degradación proteasomal de las proteínas inhibitoras de IκB citosólicas que conducen a la liberación de RelA/p50 y otros dímeros que migran al núcleo. La resíntesis de IκB (la proteína inhibidora de NFκB) contribuye a una rápida desactivación de la respuesta. Por el contrario, la activación NFκB no canónica requiere la activación de NIK a través del aumento de sus niveles y el procesamiento de NFκB2/p100 a p52 por el proteasoma, lo que resulta en una translocación nuclear de los heterodímeros p52/RelB retardada en el tiempo, y en la activación prolongada de los genes diana de NFκB2. El aumento de la transcripción de NFκB2 y RelB puede contribuir a la persistencia de la respuesta.

Como resultado de la activación de NFκB se produce la expresión de una serie de quimioquinas, entre ellas MCP-1 y CCL5 (RANTES). Aunque MCP-1 es una quimioquina resultante de la activación canónica de NFκB ¹⁴⁴, nuestro grupo de investigación también ha constatado su activación dependiente de NIK en estudios de inflamación renal ¹⁰⁴. Por otra parte, en podocitos cultivados, la activación de NFκB con TWEAK produce un aumento de la expresión tardía del mRNA de RANTES, y esto puede atribuirse a la vía no canónica ¹⁴⁵. Podemos pensar, por lo tanto, que la expresión de una misma quimioquina no es dependiente de una única vía de activación.

Habitualmente, los trabajos que estudian al desarrollo de hiperplasia intimal en los injertos arteriales, y las implicaciones del factor de transcripción NFκB, en este sentido, analizan la actividad de NFκB de forma genérica, sin centrarse en una vía en concreto. El grupo de investigación de Ward y Angelini, en trabajos con células endoteliales de cordón umbilical humano sometidas a tratamiento con BAY11-7085, un inhibidor de la IKK, sugiere, más específicamente, que es la inhibición de la activación canónica o clásica de NFκB, la que parece atenuar la respuesta inflamatoria del endotelio en las situaciones de estrés agudo. Sin embargo, la implicación de la vía alternativa no está tan detallada en la literatura. El papel de NIK y la activación de la vía no canónica del NFκB en el daño endotelial, hasta donde llega nuestro conocimiento, ha sido escasamente caracterizado, aunque sí existen estudios que asocian su actividad con la microcirculación generada en la aterosclerosis crónica y el infarto de miocardio ¹⁴⁶ y estudios que lo relacionan con la transformación de las células musculares lisas a través de las proteínas del citoesqueleto ^{147,148}.

En los resultados de esta tesis, observamos como la expresión génica a nivel de mRNA mediante RT-PCR del tejido arterial en rata identificó, entre otros marcadores, la sobreexpresión de NIK, confirmándose en estudios de inmunohistoquímica la expresión de esta proteína y su localización tanto en el endotelio hiperplásico como difusamente en la capa media de la arteria. A continuación, se caracterizó el papel patológico de NIK en la lesión endotelial mediante ratones deficientes en NIK, que demostraron estar protegidos frente a la hiperplasia intimal secundaria al daño arterial con una reducción significativa en la estenosis del vaso. Por otra parte, constatamos una elevación de los valores de MCP1 y de RANTES en el daño vascular, y la disminución de estos en

ausencia de NIK funcional, lo que podría implicar una regulación a través de la vía no canónica, también en el endotelio (Figura 28).

Nuestros datos apoyan la hipótesis de que la lesión vascular activa NIK de forma local, favoreciendo la activación no canónica de NFκB, la expresión de quimioquinas inflamatorias y el reclutamiento de leucocitos que favorecerían el engrosamiento intimal y la estenosis residual. Por lo tanto, NIK se sobreexpresa y representa un paso regulador clave que promueve la hiperplasia intimal secundaria al daño endotelial y que potencialmente podría estar sujeto a manipulación terapéutica ¹⁴⁹.

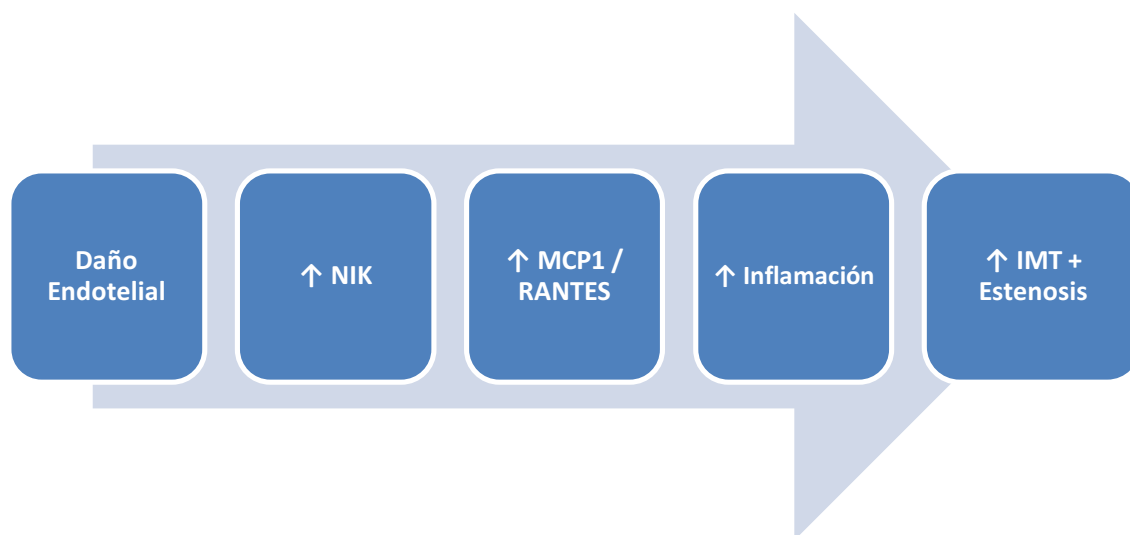


Figura 28. La lesión endotelial secundaria a un daño mecánico, promueve la activación de la vía no canónica de NFκB a través de un aumento en la expresión de su kinasa apical, NIK. Esto conlleva una elevación en los niveles de expresión de quimioquinas como MCP1 y RANTES que favorecen el reclutamiento de leucocitos aumentando el grosor intimo-medial (IMT) del vaso dañado y produciendo una estenosis progresiva de su luz.

4. VDR y el daño vascular

Hemos estudiado el efecto de los derivados de la vitamina D y de su receptor como agentes reguladores de la hiperplasia intimal. La vitamina D es un importante regulador

del metabolismo del calcio, pero además tiene una serie de efectos pleiotrópicos. Por ejemplo, se sabe que tiene un importante efecto antiproliferativo en algunos sistemas celulares¹⁵⁰. Este efecto antiproliferativo aplicado a las células de músculo liso vascular, podría disminuir el grado de hiperplasia intimal que se produce secundariamente a la lesión endotelial. Se ha postulado que la vitamina D y sus metabolitos interfieren no solo controlando el crecimiento y la proliferación celular, sino también regulando los mecanismos de apoptosis¹⁵¹. Estos efectos se han constatado en varios tipos de células que poseen receptores de vitamina D. La mayoría de los estudios relacionados con el efecto antiproliferativo de la vitamina D, no obstante, se han llevado a cabo sobre ciertas patologías oncológicas¹⁵². Sin embargo, también existen en la literatura estudios que relacionan los efectos de la vitamina D como modulador de la proliferación de células musculares lisas vasculares, del factor de crecimiento epidérmico (EGF), o de la expresión del gen de la elastina en medios de cultivo celular^{150,153}, condiciones todas ellas que, como ya se ha comprobado, disminuyen el desarrollo de hiperplasia intimal en experimentos funcionales in vivo, tras una agresión vascular⁷⁷.

El paricalcitol es un análogo de la vitamina D de tercera generación empleado para el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario en pacientes con ERC. Se considera un activador selectivo del receptor de vitamina D (VDR). El VDR se ha identificado en diferentes tipos de tejidos humanos, incluido las células de músculo liso del sistema cardiovascular y células del sistema inmunitario⁸³. Se ha observado en diferentes estudios que, paricalcitol, además del efecto puramente relacionado con la homeostasis mineral y ósea, ejerce acciones sobre el sistema cardiovascular regulando la proliferación y diferenciación de células del músculo liso, actuando sobre los procesos de trombosis y fibrinólisis, en procesos de contracción y relajación del vaso y en el proceso de regeneración endotelial⁷². En este estudio nos hemos cuestionado si este efecto antiinflamatorio modulado por paricalcitol se produce mediante la regulación de alguna de las vías de activación del complejo proteico NFκB. Estudiamos este efecto a nivel de expresión morfológica de la lesión, a nivel de posibles factores de crecimiento implicados y a nivel de citoquinas y receptores relacionadas con la activación del NFκB.

En primer lugar, confirmamos que en el estudio morfométrico, nuestros hallazgos eran consistentes con la literatura publicada, habiendo demostrado los resultados una marcada reducción de la estenosis secundaria a hiperplasia intimal en el grupo de ratas tratadas

con paricalcitol. El porcentaje de estenosis en las arterias de ratas tratadas con paricalcitol fue del 36.5% frente a las ratas control que presentaban un porcentaje de estenosis del 72.9%. A pesar de estas diferencias, no se obtuvo significación estadística ($p=0.11$) debido al reducido número de la muestra. No pudimos validar con otros estudios el efecto del paricalcitol sobre la hiperplasia intimal ya que no encontramos modelos experimentales exactamente iguales en la literatura. En algunos trabajos sobre los efectos de la vitamina D en las anastomosis vasculares de arterias de conejos, obtuvieron un ratio I/M de 0.20 en los grupos de especímenes tratados en este sentido⁷⁷, que es próximo al resultado que obtuvimos en nuestro grupo de ratas tratadas con paricalcitol (0.17).

Se sabe que uno de los mecanismos que contribuyen al efecto beneficioso de los análogos de vitamina D sobre la reducción de la morbi-mortalidad en paciente con insuficiencia renal crónica, podría ser la modulación de las células del músculo liso vascular a través de la vía de activación del receptor VDR. El VDR regula la expresión de una serie de genes. Nuestro estudio reveló que paricalcitol reducía la expresión local de mRNA de los factores que habíamos identificado como mediadores del daño vascular. Existen diferentes estudios que demuestran que GDF15 es un gen directamente regulado por VDR en patología oncológica como el cáncer colorrectal o el de próstata¹⁵⁴. Sin embargo, no hemos encontrado estudios que relacionen a GDF15 y VDR en el contexto del daño vascular, donde, hipotéticamente, la sobreexpresión de GDF15 debería conducir al desarrollo de hiperplasia intimal. Nuestros resultados serían coherentes en este sentido ya que encontramos una disminución de los niveles de GDF15 en las muestras tratadas con paricalcitol. Por otra parte, en estudios sobre inflamación renal, se ha demostrado que la acción inmunomoduladora, que tienen los derivados de la vitamina D sobre las vías de señalización del NF κ B, resulta en la regulación de la expresión de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias como RANTES, MCP-1 y TNF- α ^{99,155–157}. Hasta la fecha se han realizado múltiples estudios que ponen de manifiesto el efecto que tiene la vitamina D disminuyendo los niveles de MCP-1 en experimentos in vitro por ejemplo con monocitos, macrófagos y preadipocitos^{158,159}. Sin embargo, no se dispone de datos que analicen los efectos de paricalcitol sobre la expresión local de esta citoquina sobre tejido vascular en experimentos in vivo. Nuestro estudio muestra una disminución significativa de los niveles de mRNA de MCP-1/CCL2 tras el tratamiento con paricalcitol con respecto al grupo control. Estos resultados sugerían que el paricalcitol inhibía la infiltración inflamatoria en el daño vascular y la expresión de MCP-1, tal vez promoviendo algún

tipo de secuestro de la señalización de NF κ B mediado por VDR (Figura 29). Con respecto a los receptores de citoquinas, se sabe que la activación citoplasmática de NF κ B se lleva a cabo a través de la activación de receptores celulares de membrana como CD74. El papel preciso de CD74 en el daño endotelial y su relación con la vitamina D también son mal conocidos. Sin embargo, nuestros análisis indican que VDR podría modular de algún modo esta vía, ya que se encontró una reducción significativa de los niveles de expresión de CD74 en el endotelio y en la capa media de las arterias tratadas con paricalcitol.

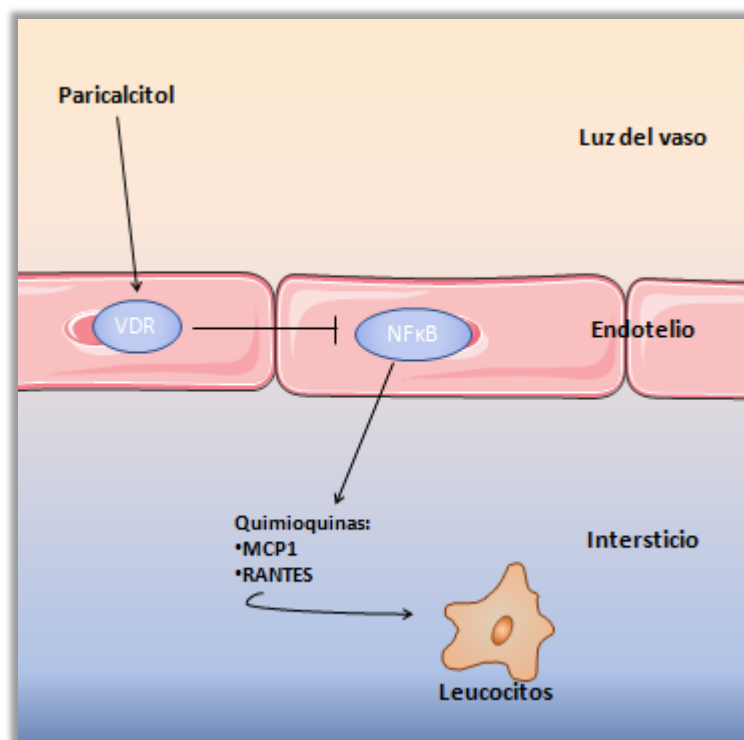


Figura 29. Esquema de los efectos moleculares de paricalcitol en el daño endotelial. La lesión del endotelio activa el factor de transcripción nuclear-κB (NF-κB) y conducen a la producción de citoquinas inflamatorias y a la infiltración de leucocitos. La vitamina D y sus análogos se unen al receptor de vitamina D (VDR) e inhiben la transcripción de dichas citoquinas bloqueando la vía no canónica de activación del NF-κB.

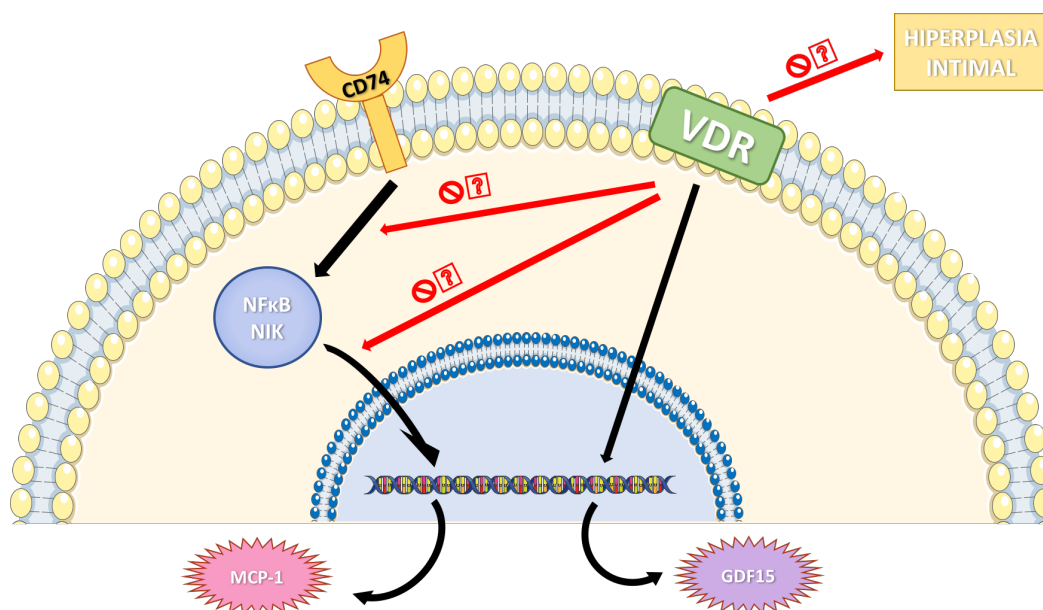


Figura 30. Representación esquemática de posibles interacciones de VDR con la vía de señalización NFκB.

Por último, centramos nuestro interés en la expresión de componentes específicos de la vía de activación no canónica de NFκB. Como hemos indicado anteriormente, el papel de NIK y su implicación en la patología endotelial vascular, ha sido escasamente estudiado ¹⁴⁷. Nuestro estudio indica que los niveles de NIK tras el daño endotelial aumentan localmente en el endotelio y en la capa media, contribuyendo al desarrollo de hiperplasia intimal. Sin embargo, hay pocos estudios que relacionen la actividad de NFκB con la activación del VDR, ya no solo en el daño endotelial sino en patologías en cualquier otro contexto, y aún menos de la relación existente entre el VDR y la vía de activación no canónica a través de NIK. Sí existen trabajos que indican que la vitamina D tendría un efecto preventivo de la calcificación de células musculares lisas en estudios *in vitro* ¹⁶⁰. La vitamina D y sus efectos inhibitorios sobre NFκB están siendo estudiados de forma más amplia también en patología oncológica ¹⁶¹. En nuestro estudio objetivamos una reducción significativa en los niveles de expresión de la NIK en el grupo de ratas tratadas con paricalcitol, sugiriendo un efecto antiinflamatorio, posiblemente a través de VDR, en el daño vascular. Es más, la disminución de NIK podría explicar la protección vascular resultante de la activación de receptores de vitamina D.

Así pues, como apuntan otros trabajos ¹⁶² y a tenor de estos resultados expuestos, podríamos suponer que la visión clásica de VDR, solo como un factor de transcripción modulado por ligando de acción nuclear, podría quedar obsoleta. VDR y su ligando, en este caso paricalcitol, constituyen un regulador multinivel que actúan en rutas de señalización como NFκB, directa o indirectamente a través de una variedad de mecanismos diferentes y a diferentes niveles: receptores de membrana, moléculas de señalización citosólica o factores de transcripción nucleares (Figura 30). Por lo tanto, la acción de la vitamina D, sobre el endotelio vascular, podría estar mediada no solo por VDR nuclear, sino por otros efectos extranucleares no canónicos.

5. NIK como diana terapéutica

El factor de transcripción NFκB es activado a través de dos rutas principales de transducción de señales: canónica y alternativa. El componente regulador central de la vía alternativa es NIK, también conocido como MAP3K14.

La función de NF-κB es específica en cada estirpe celular. Existen abundantes compuestos que inhiben la señalización de NF-κB pero que carecen de especificidad. Por lo tanto, aunque el bloqueo de la señalización fuera beneficioso para ciertas enfermedades cardiovasculares, conservar la actividad de NF-κB es crítica para el mantenimiento del sistema inmune, la respuesta inflamatoria y la homeostasis. Por lo tanto, las estrategias dirigidas a atacar al sistema NF-κB en humanos deben manejarse con absoluta precaución, centrándose en terapias dirigidas específicamente sobre una estirpe celular

¹⁶³

La expresión de NIK también es ubicua. Funciona como una quinasa crucial para la vía no canónica de NF-κB y contribuye a diversos procesos celulares, que van desde la regulación de la inmunidad adaptativa e innata hasta el crecimiento y la supervivencia del cáncer. La regulación de la función de NIK no está completamente clara. Las células en condiciones fisiológicas no expresan NIK de forma abundante. Los datos sugieren que el NIK endógeno está ubiquitinado en condiciones basales, por lo que las concentraciones

de NIK son bajas en las células quiescentes como resultado de una rápida degradación y otra serie de regulaciones a la baja ¹⁶⁴. Sin embargo, en contextos patológicos, como el cáncer, NIK se estabiliza y aumenta su concentración. Las eventuales mutaciones en estos “reguladores negativos” así como en el propio NIK, conducen su acumulación en la célula. Se piensa que éste es el principal mecanismo de activación del sistema, y ésta podría ser una causa de la desregulación de NFκB en cánceres y patologías de tipo inflamatorio. Las citoquinas y el estrés oxidativo también promueven el aumento y la activación de NIK ¹⁶⁴.

NIK y la vía no canónica de activación del NFκB están bien caracterizados en el sistema inmune, pero, hasta la fecha, la información que se tiene sobre su actividad en otros tejidos, como podría ser el endotelio arterial, es escasa. Por otra parte, se sabe que el sistema NFκB tiene una implicación directa en los procesos de angiogénesis en condiciones fisiológicas, como el propio desarrollo, y en condiciones patológicas, como la inflamación crónica o los procesos tumorales. Pero además, estudios recientes demuestran que la vía no canónica, regulada por NIK, desarrolla un papel esencial en la angiogénesis exclusivamente patológica ¹⁶⁵. Por lo tanto, sería lógico preguntarse si es posible atenuar la función de NIK para hacer frente a procesos patológicos vasculares sin que ello tenga repercusión en funciones fisiológicas normales.

A pesar de la evidencia del papel de la activación de la vía canónica de NFκB en la lesión endotelial ¹⁶⁶, aún no existen abordajes terapéuticos dirigidos específicamente a la inactivación del sistema NFκB en clínica. Actualmente ya se está estudiando la efectividad de terapias moleculares que silencian la actividad de NFκB, bien mediante el uso de inhibidores de MAP kinasas o con oligodesoxinucleótidos señuelos de NFκB, en modelos animales de anastomosis vasculares ¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. Incluso se han llevado a cabo ensayos en humanos. Quizás el más paradigmático sea el estudio PREVENT III, un ensayo clínico prospectivo, randomizado y multicéntrico llevado a cabo en 2006, que probaba la efectividad de Edifoligide (un oligodesoxinucleótido que actúa como señuelo para inhibir al factor de transcripción E2F) en los injertos de vena de pacientes resvascularizados por isquemia crítica de miembros inferiores ¹⁶. El ensayo, no obstante, fue suspendido, ya que los resultados no parecían ser superiores al uso de placebo. Estos resultados sugerían que la inhibición aislada de un único factor de transcripción no resulta

suficiente para prevenir la hiperplasia intimal, ya que los mecanismos moleculares que subyacen a su desarrollo son múltiples.

Por lo tanto, en una patología inflamatoria, dirigir los esfuerzos terapéuticos hacia una sola molécula para proporcionar un beneficio que sea clínicamente relevante, es complicado. Sin embargo, la identificación de NIK como un mediador de inflamación en la lesión vascular, y la posibilidad de que su activación se produzca exclusivamente en situaciones patológicas, abre la posibilidad de abordarlo directamente para evitar la proliferación de células del músculo liso, por lo que la inhibición específica de NIK, podría ser útil en estas enfermedades.

Existen estudios sobre modelos de estructuras moleculares de NIK que identifican dominios para quinasas catalíticas y que han permitido el desarrollo de nuevos inhibidores ^{149,171}. Actualmente existen inhibidores específicos para NIK que ya se están estudiando por ejemplo en terapias contra el cáncer, el mieloma o patologías inflamatorias como el lupus, tanto in vitro como in vivo, con mejoría de la supervivencia en ratones así como reducción de la patología renal derivada del propio lupus ¹⁷²⁻¹⁷⁴. Estos inhibidores también se han usado de forma específica contra células endoteliales activadas por citoquinas ¹⁷⁵. Nuestro grupo también tiene una patente sobre el uso terapéutico de siRNAs para NIK, que se ha desarrollado a partir de estudios en el fracaso renal agudo.

Los estudios preclínicos in vivo, demuestran que NIK es un objetivo terapéutico prometedor para el tratamiento de la hiperplasia intimal, sin embargo aún queda mucho por aprender sobre el uso clínico apropiado de los inhibidores de NIK, incluido su perfil de seguridad y su capacidad para sinergizarse con otros agentes convencionales o biológicos ¹⁷⁶.

Con nuestros datos proporcionamos evidencia de la contribución, al menos parcial, de NIK en la regulación de la inflamación y de la respuesta apoptosis/proliferación celular en las células endoteliales y el daño vascular. Por otra parte, aportamos nueva luz sobre el proceso de activación de NIK, demostrando que, en el curso del daño vascular, también se elevan los niveles de mRNA de NIK, lo que podría contribuir junto con la menor degradación de la proteína NIK, a aumentar los niveles de esta última. Lo que además hemos observado, es que el tratamiento con paricalcitol podría reducir su expresión contribuyendo a disminuir la inflamación.

En definitiva, nuestro estudio demuestra que la vía de activación no canónica del NF κ B, en un modelo de daño endotelial, puede estar regulada a través del VDR y que, de algún modo, la activación del VDR con derivados análogos de vitamina D puede contribuir a la disminución de la hiperplasia intimal.

VII. CONCLUSIONES

*“El éxito es la capacidad de ir de un fracaso a otro
sin perder el entusiasmo.”*

Winston Churchill

1. El paricalcitol tiene un efecto protector en el daño vascular causado por lesión endotelial que se asocia a un cambio de la expresión de varios mediadores potenciales de la lesión tisular: disminución de la expresión de quimioquinas (MCP-1), receptores de citoquinas (CD74), factores de crecimiento (GDF15) y quinasas activadoras de NF- κ B (NIK).
2. NIK es un mediador del daño vascular por lesión endotelial que favorece la inflamación local y sistémica y podría ser una nueva diana terapéutica.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

“Ya no estamos en la era de la información.

Estamos en la era de la gestión

de la información.”

Chris Hardwick

1. INE. Defunciones por causas (lista reducida), sexo y edad . <http://www.ine.es/jaxi/tabla.do?type=pcaxis&path=/t15/p417/a2012/10/&file=01001.px>. Accessed November 24, 2017.
2. Fowkes FGR, Rudan D, Rudan I, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet (London, England)*. 2013;382(9901):1329-1340.
3. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*. 2007;45 Suppl S(1):S5-67.
4. Green RM, Abbott WM, Matsumoto T, et al. Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: five-year results of a randomized trial. *J Vasc Surg*. 2000;31(3):417-425.
5. Klinkert P, van Dijk PJE, Breslau PJ. Polytetrafluoroethylene femorotibial bypass grafting: 5-year patency and limb salvage. *Ann Vasc Surg*. 2003;17(5):486-491.
6. Veith FJ, Gupta SK, Ascer E, et al. Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. *J Vasc Surg*. 1986;3(1):104-114.
7. Imparato AM, Bracco A, Kim GE, Zeff R. Intimal and neointimal fibrous proliferation causing failure of arterial reconstructions. *Surgery*. 1972;72(6):1007-1017.
8. Boyle EM, Lille ST, Allaire E, Clowes AW, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: atherosclerosis. *Ann Thorac Surg*. 1997;63(3):885-894.
9. Ahanchi SS, Tsihlis ND, Kibbe MR. The role of nitric oxide in the pathophysiology of intimal hyperplasia. *J Vasc Surg*. 2007;45 Suppl A(6):A64-73.
10. Indolfi C, Mongiardo A, Curcio A, Torella D. Molecular mechanisms of in-stent restenosis and approach to therapy with eluting stents. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13(4):142-148.
11. Lüscher TF, Yang Z, Kiowski W, Linder L, Dohi Y, Diederich D. Endothelin-induced vasoconstriction and calcium antagonists. *J Hum Hypertens*. 1992;6 Suppl 2:S3-8.
12. Caro CG, Seneviratne A, Heraty KB, et al. Intimal hyperplasia following implantation of helical-centreline and straight-centreline stents in common carotid

- arteries in healthy pigs: influence of intraluminal flow. *J R Soc Interface*. 2013;10(89):20130578-20130578.
13. Tsai S, Butler J, Rafii S, Liu B, Kent KC. The role of progenitor cells in the development of intimal hyperplasia. *J Vasc Surg*. 2009;49(2):502-510.
 14. Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg*. 1994;81(9):1254-1269.
 15. Wallitt EJW, Jevon M, Hornick PI. Therapeutics of vein graft intimal hyperplasia: 100 years on. *Ann Thorac Surg*. 2007;84(1):317-323.
 16. Conte MS, Bandyk DF, Clowes AW, et al. Results of PREVENT III: a multicenter, randomized trial of edifoligide for the prevention of vein graft failure in lower extremity bypass surgery. *J Vasc Surg*. 2006;43(4):742-751; discussion 751.
 17. Bhasin M, Huang Z, Pradhan-Nabzdyk L, et al. Temporal Network Based Analysis of Cell Specific Vein Graft Transcriptome Defines Key Pathways and Hub Genes in Implantation Injury. Esteban FJ, ed. *PLoS One*. 2012;7(6):e39123.
 18. Pradhan-Nabzdyk L, Huang C, LoGerfo FW, Nabzdyk CS. Current siRNA targets in atherosclerosis and aortic aneurysm. *Discov Med*. 2014;17(95):233-246.
 19. Yasukawa H, Imaizumi T, Matsuoka H, Nakashima A, Morimatsu M. Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury by antibodies to intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. *Circulation*. 1997;95(6):1515-1522.
 20. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Perkins JA. *Robbins Basic Pathology*.
 21. Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 20):4589-4592.
 22. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18(1):621-663.
 23. Qin H, Wilson CA, Lee SJ, Zhao X, Benveniste EN. LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia. *Blood*. 2005;106(9):3114-3122.
 24. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol*. 2000;165(2):1013-1021.
 25. Fitzgerald DC, Meade KG, McEvoy AN, et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol*

- Immunopathol.* 2007;116(1-2):59-68.
26. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, et al. NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(8):1254-1262.
 27. Tergaonkar V. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(10):1647-1653.
 28. Poveda J, Tabara LC, Fernandez-Fernandez B, et al. TWEAK/Fn14 and Non-Canonical NF-kappaB Signaling in Kidney Disease. *Front Immunol.* 2013;4:447.
 29. Xiao G, Fong A, Sun S-C. Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem.* 2004;279(29):30099-30105.
 30. Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, et al. Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. *Blood.* 2008;111(10):5118-5129.
 31. Basak S, Shih VF-S, Hoffmann A. Generation and Activation of Multiple Dimeric Transcription Factors within the NF- B Signaling System. *Mol Cell Biol.* 2008;28(10):3139-3150.
 32. Ghosh S, Dass JFP. Study of pathway cross-talk interactions with NF-κB leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. *Gene.* 2016;584(1):97-109.
 33. Sheikh MS, Huang Y. Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell Cycle.* 2(6):550-552.
 34. Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, et al. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(15):5634-5639.
 35. Bonizzi G, Bebien M, Otero DC, et al. Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J.* 2004;23(21):4202-4210.
 36. Ashall L, Horton CA, Nelson DE, et al. Pulsatile Stimulation Determines Timing and Specificity of NF- B-Dependent Transcription. *Science (80-).* 2009;324(5924):242-246.
 37. Rocha S, Campbell KJ, Perkins ND. p53- and Mdm2-independent repression of NF-kappa B transactivation by the ARF tumor suppressor. *Mol Cell.*

- 2003;12(1):15-25.
38. Sanchez-Niño MD, Benito-Martin A, Gonçalves S, et al. TNF superfamily: a growing saga of kidney injury modulators. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:1-11.
 39. Leng L, Metz CN, Fang Y, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med.* 2003;197(11):1467-1476.
 40. Morand EF, Leech M, Bernhagen J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(5):399-410.
 41. Rice EK, Tesch GH, Cao Z, et al. Induction of MIF synthesis and secretion by tubular epithelial cells: a novel action of angiotensin II. *Kidney Int.* 2003;63(4):1265-1275.
 42. Kudrin A, Scott M, Martin S, et al. Human macrophage migration inhibitory factor: a proven immunomodulatory cytokine? *J Biol Chem.* 2006;281(40):29641-29651.
 43. Toso C, Emamaullee JA, Merani S, Shapiro AMJ. The role of macrophage migration inhibitory factor on glucose metabolism and diabetes. *Diabetologia.* 2008;51(11):1937-1946.
 44. Valiño-Rivas L, Baeza-Bermejillo C, Gonzalez-Lafuente L, Sanz AB, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. CD74 in Kidney Disease. *Front Immunol.* 2015;6:483.
 45. Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Ihalmó P, et al. The MIF receptor CD74 in diabetic podocyte injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(2):353-362.
 46. Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Ruiz-Andres O, et al. MIF, CD74 and other partners in kidney disease: tales of a promiscuous couple. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24(1):23-40.
 47. Martín-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Muñoz-García B, et al. Increased CD74 expression in human atherosclerotic plaques: contribution to inflammatory responses in vascular cells. *Cardiovasc Res.* 2009;83(3):586-594.
 48. Martín-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Muñoz-García B, et al. Increased CD74 expression in human atherosclerotic plaques: contribution to inflammatory responses in vascular cells. *Cardiovasc Res.* 2009;83(3):586-594.
 49. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res.* 2004;95(9):858-866.
 50. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001;2(2):108-115.
 51. Laing KJ, Secombes CJ. Chemokines. *Dev Comp Immunol.* 2004;28(5):443-460.
 52. Perez-Gomez MV, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, et al. Targeting inflammation in

- diabetic kidney disease: early clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*. 2016;25(9):1045-1058.
53. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999;398(6729):718-723.
54. Rossi DL, Hardiman G, Copeland NG, et al. Cloning and characterization of a new type of mouse chemokine. *Genomics*. 1998;47(2):163-170.
55. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000;95(10):3032-3043.
56. Fairlie WD, Moore AG, Bauskin AR, Russell PK, Zhang HP, Breit SN. MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 1999;65(1):2-5.
57. Bonaterra GA, Zügel S, Thogersen J, et al. Growth differentiation factor-15 deficiency inhibits atherosclerosis progression by regulating interleukin-6-dependent inflammatory response to vascular injury. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(6):e002550.
58. Mazagova M, Buikema H, Landheer SW, et al. Growth differentiation factor 15 impairs aortic contractile and relaxing function through altered caveolar signaling of the endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(5):H709-18.
59. Gohar A, Gonçalves I, Vrijenhoek J, et al. Circulating GDF-15 levels predict future secondary manifestations of cardiovascular disease explicitly in women but not men with atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 2017;241:430-436.
60. Andersson C, Enserro D, Sullivan L, et al. Relations of circulating GDF-15, soluble ST2, and troponin-I concentrations with vascular function in the community: The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*. 2016;248:245-251.
61. Hagström E, James SK, Bertilsson M, et al. Growth differentiation factor-15 level predicts major bleeding and cardiovascular events in patients with acute coronary syndromes: results from the PLATO study. *Eur Heart J*. 2016;37(16):1325-1333.
62. Andersson C, Preis SR, Beiser A, et al. Associations of Circulating Growth Differentiation Factor-15 and ST2 Concentrations With Subclinical Vascular Brain Injury and Incident Stroke. *Stroke*. 2015;46(9):2568-2575.
63. Ratnam NM, Peterson JM, Talbert EE, et al. NF-κB regulates GDF-15 to suppress macrophage surveillance during early tumor development. *J Clin Invest*.

- 2017;127(10):3796-3809.
64. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(1):F8-28.
 65. Artaza JN, Contreras S, Garcia LA, et al. Vitamin D and cardiovascular disease: potential role in health disparities. *J Health Care Poor Underserved*. 2011;22(4 Suppl):23-38.
 66. Heaney RP. Vitamin D in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(5):1535-1541.
 67. Hsia J, Heiss G, Ren H, et al. Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation*. 2007;115(7):846-854.
 68. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, et al. Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2008;117(4):503-511.
 69. Wong YYE, Flicker L, Yeap BB, McCaul KA, Hankey GJ, Norman PE. Is hypovitaminosis D associated with abdominal aortic aneurysm, and is there a dose-response relationship? *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2013;45(6):657-664.
 70. Parker J, Hashmi O, Dutton D, et al. Levels of vitamin D and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *Maturitas*. 2010;65(3):225-236.
 71. Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Hypertens*. 2007;20(7):713-719.
 72. Wu-Wong JR, Nakane M, Ma J, Ruan X, Kroeger PE. Effects of Vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2006;186(1):20-28.
 73. Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;103(3-5):521-524.
 74. Panichi V, De Pietro S, Andreini B, et al. Calcitriol modulates in vivo and in vitro cytokine production: a role for intracellular calcium. *Kidney Int*. 1998;54(5):1463-1469.
 75. Talmor Y, Golan E, Benchetrit S, et al. Calcitriol blunts the deleterious impact of advanced glycation end products on endothelial cells. *Am J Physiol Physiol*. 2008;294(5):F1059-F1064.
 76. Sun J, Kong J, Duan Y, et al. Increased NF-kappaB activity in fibroblasts lacking

- the vitamin D receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(2):E315-22.
77. Yurekli I, Gokalp O, Kiray M, et al. Experimental research Effect of 1α -25-dihydroxyvitamin D 3 on intimal hyperplasia developing in vascular anastomoses: a rabbit model. *Arch Med Sci.* 2013;3:404-408.
 78. Gardner DG, Chen S, Glenn DJ. Vitamin D and the heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013;305(9):R969-77
 79. Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2007;167(16):1730-1737.
 80. Elamin MB, Abu Elnour NO, Elamin KB, et al. Vitamin D and Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1931-1942.
 81. Gonzalez-Parra E, Rojas-Rivera J, Tuñón J, Praga M, Ortiz A, Egido J. Vitamin D receptor activation and cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27 Suppl 4(suppl 4):iv17-21.
 82. Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido J. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(9):2850-2865.
 83. Andress DL. Vitamin D in chronic kidney disease: a systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int.* 2006;69(1):33-43.
 84. Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD. Cholecalciferol Supplementation Alters Calcitriol-Responsive Monocyte Proteins and Decreases Inflammatory Cytokines in ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(2):353-361.
 85. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(5 Suppl 3):S112-9.
 86. Ortiz A, Covic A, Fliser D, et al. Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *Lancet (London, England).* 2014;383(9931):1831-1843.
 87. Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res.* 2006;21(3):484-490.
 88. Mathew S, Lund RJ, Chaudhary LR, Geurs T, Hruska KA. Vitamin D receptor activators can protect against vascular calcification. *J Am Soc Nephrol.*

- 2008;19(8):1509-1519.
89. Cheng J, Zhang W, Zhang X, Li X, Chen J. Efficacy and Safety of Paricalcitol Therapy for Chronic Kidney Disease: A Meta-Analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(3):391-400.
 90. Egido J, Martínez-Castelao A, Bover J, et al. The pleiotropic effects of paricalcitol: Beyond bone-mineral metabolism. *Nefrologia*. 2016;36(1):10-18.
 91. Coyne DW, Goldberg S, Faber M, Ghossein C, Sprague SM. A randomized multicenter trial of paricalcitol versus calcitriol for secondary hyperparathyroidism in stages 3-4 CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(9):1620-1626.
 92. Nakane M, Ma J, Rose AE, Osinski MA, Wu-Wong JR. Differential effects of Vitamin D analogs on calcium transport. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;103(1):84-89.
 93. Li X, Speer MY, Yang H, Bergen J, Giachelli CM. Vitamin D Receptor Activators Induce an Anticalcific Paracrine Program in Macrophages: Requirement of Osteopontin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(2):321-326.
 94. Ketteler M, Martin KJ, Wolf M, et al. Paricalcitol versus cinacalcet plus low-dose vitamin D therapy for the treatment of secondary hyperparathyroidism in patients receiving haemodialysis: results of the IMPACT SHPT study. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(8):3270-3278.
 95. Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med*. 2003;349(5):446-456.
 96. Thadhani R, Appelbaum E, Pritchett Y, et al. Vitamin D Therapy and Cardiac Structure and Function in Patients With Chronic Kidney Disease. *JAMA*. 2012;307(7):674.
 97. Gravellone L, Rizzo MA, Martina V, Mezzina N, Regalia A, Gallieni M. Vitamin D Receptor Activators and Clinical Outcomes in Chronic Kidney Disease. *Int J Nephrol*. 2011;2011:1-13.
 98. Husain K, Ferder L, Mizobuchi M, Finch J, Slatopolsky E. Combination therapy with paricalcitol and enalapril ameliorates cardiac oxidative injury in uremic rats. *Am J Nephrol*. 2009;29(5):465-472.
 99. Sanchez-Niño M-D, Bozic M, Córdoba-Lanús E, et al. Beyond proteinuria: VDR activation reduces renal inflammation in experimental diabetic nephropathy. *Am J*

- Physiol Renal Physiol.* 2012;302(6):F647-57.
100. Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Zhang WX, Taubman MB, Reis ED. Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(2):335-342.
 101. Lu X, Guo X, Linares C, Kassab GS. A new method to denude the endothelium without damage to media: structural, functional, and biomechanical validation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(5):H1889-94.
 102. Lee F-Y, Lu H-I, Chai H-T, et al. Circulating microparticles enhanced rat vascular wall remodeling following endothelial denudation. *Am J Transl Res.* 2016;8(11):4511-4522.
 103. Sánchez-Valdepeñas C, Martín AG, Ramakrishnan P, Wallach D, Fresno M. NF-kappaB-inducing kinase is involved in the activation of the CD28 responsive element through phosphorylation of c-Rel and regulation of its transactivating activity. *J Immunol.* 2006;176(8):4666-4674.
 104. Ortiz A, Husi H, Gonzalez-Lafuente L, et al. Mitogen-Activated Protein Kinase 14 Promotes AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(3):823-836.
 105. Gallo R, Padurean A, Toschi V, et al. Prolonged thrombin inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation.* 1998;97(6):581-588.
 106. Silvestre-Roig C, Fernández P, Esteban V, et al. Inactivation of nuclear factor- κ B inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(5):1036-1045.
 107. Gupta GK, Agrawal T, Rai V, Del Core MG, Hunter WJ, Agrawal DK. Vitamin D Supplementation Reduces Intimal Hyperplasia and Restenosis following Coronary Intervention in Atherosclerotic Swine. Singla DK, ed. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156857.
 108. de Jager SCA, Bermúdez B, Bot I, et al. Growth differentiation factor 15 deficiency protects against atherosclerosis by attenuating CCR2-mediated macrophage chemotaxis. *J Exp Med.* 2011;208(2):217-225.
 109. Gibbons GH, Dzau VJ, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994;330(20):1431-1438.
 110. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and

- restenosis. *Circ Res*. 1995;77(3):445-465.
111. John J. Ricotta. Conductos Vasculares. In: ESPAÑA SAE, ed. *Rutherford: Tratado de Cirugía Vascular*. 6th ed. Madrid; 2006:2612.
 112. Moriarty JP, Murad MH, Shah ND, et al. A systematic review of lower extremity arterial revascularization economic analyses. *J Vasc Surg*. 2011;54(4):1131-1144.e1.
 113. Dosluoglu HH, Lall P, Harris LM, Dryjski ML. Long-term limb salvage and survival after endovascular and open revascularization for critical limb ischemia after adoption of endovascular-first approach by vascular surgeons. *J Vasc Surg*. 2012;56(2):361-371.e3.
 114. Gruberg L, Waksman R, Satler LF, Pichard AD, Kent KM. Novel approaches for the prevention of restenosis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000;9(11):2555-2578.
 115. Miyachi H, Takahashi M, Komori K. A Novel Approach against Vascular Intimal Hyperplasia Through the Suppression of Girdin. *Ann Vasc Dis*. 2015;8(2):69-73.
 116. Lafont A, Faxon D. Why do animal models of post-angioplasty restenosis sometimes poorly predict the outcome of clinical trials? *Cardiovasc Res*. 1998;39(1):50-59.
 117. Mongiardo A, Curcio A, Spaccarotella C, Parise S, Indolfi C. Molecular mechanisms of restenosis after percutaneous peripheral angioplasty and approach to endovascular therapy. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2004;4(3):275-287.
 118. Ferrell M, Fuster V, Gold HK, Chesebro JH. A dilemma for the 1990s. Choosing appropriate experimental animal model for the prevention of restenosis. *Circulation*. 1992;85(4):1630-1631.
 119. Cullen P, Baetta R, Bellosta S, et al. Rupture of the atherosclerotic plaque: does a good animal model exist? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(4):535-542.
 120. De Meyer GR, Bult H. Mechanisms of neointima formation--lessons from experimental models. *Vasc Med*. 1997;2(3):179-189.
 121. Moser J, van Ark J, van Dijk MC, et al. Distinct Differences on Neointima Formation in Immunodeficient and Humanized Mice after Carotid or Femoral Arterial Injury. *Sci Rep*. 2016;6:35387.
 122. Geary RL, Kohler TR, Vergel S, Kirkman TR, Clowes AW. Time course of flow-induced smooth muscle cell proliferation and intimal thickening in endothelialized

- baboon vascular grafts. *Circ Res*. 1994;74(1):14-23.
123. Wu L, Zhu L, Shi WH, Yu B, Cai D. Zoledronate inhibits intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011;41(2):288-293.
124. Moroi M, Zhang L, Yasuda T, et al. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest*. 1998;101(6):1225-1232.
125. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*. 1998;82(11):1111-1129.
126. Yue Y, Ma K, Li Z, Wang Z. Angiotensin II type 1 receptor-associated protein regulates carotid intimal hyperplasia through controlling apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(2):2030-2037.
127. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*. 1995;91(11):2703-2711.
128. Isner JM, Walsh K, Symes J, et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*. 1995;91(11):2687-2692.
129. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, et al. Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. *Circulation*. 1995;91(11):2802-2809.
130. Landry DB, Couper LL, Bryant SR, Lindner V. Activation of the NF-kappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Pathol*. 1997;151(4):1085-1095.
131. Cercek B, Yamashita M, Dimayuga P, et al. Nuclear factor-kappaB activity and arterial response to balloon injury. *Atherosclerosis*. 1997;131(1):59-66.
132. Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K, et al. Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element “decoy” of nuclear factor-kappaB binding site as a novel molecular strategy. *Gene Ther*. 2001;8(21):1635-1642.
133. Takeuchi K, Itoh H, Yonemitsu Y, et al. In vivo reduction of the nuclear factor-kappaB activity using synthetic cis-element decoy oligonucleotides suppresses intimal hyperplasia in the injured carotid arteries in rabbits. *Surg Today*.

- 2007;37(7):575-583
134. Osako MK, Nakagami H, Morishita R. Modification of decoy oligodeoxynucleotides to achieve the stability and therapeutic efficacy. *Curr Top Med Chem*. 2012;12(15):1603-1607.
 135. Milstone DS, Ilyama M, Chen M, et al. Differential role of an NF- κ B transcriptional response element in endothelial versus intimal cell VCAM-1 expression. *Circ Res*. 2015;117(2):166-177.
 136. Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, Cybulsky MI. The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(16):9052-9057.
 137. Shimizu N, Azuma N, Nishikawa T, et al. Effect on vein graft intimal hyperplasia of nuclear factor-kB decoy transfection using the second generation of HVJ vector. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2007;48(4):463-470.
 138. Shintani T, Sawa Y, Takahashi T, et al. Intraoperative transfection of vein grafts with the NFkappaB decoy in a canine aortocoronary bypass model: a strategy to attenuate intimal hyperplasia. *Ann Thorac Surg*. 2002;74(4):1132-7; discussion 1137-8.
 139. Starlets D, Gore Y, Binsky I, et al. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood*. 2006;107(12):4807-4816.
 140. Wilkinson RDA, Magorrian SM, Williams R, et al. CCL2 is transcriptionally controlled by the lysosomal protease cathepsin S in a CD74-dependent manner. *Oncotarget*. 2015;6(30):29725-29739.
 141. Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert CA. Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int*. 1995;48(4):1263-1271.
 142. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science*. 2001;293(5534):1495-1499.
 143. Zhao Y, Banerjee S, LeJeune WS, Choudhary S, Tilton RG. NF- κ B-inducing kinase increases renal tubule epithelial inflammation associated with diabetes. *Exp Diabetes Res*. 2011;2011:192564.
 144. Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The IkappaB-NF-kappaB

- signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*. 2002;298(5596):1241-1245.
145. Valiño-Rivas L, Gonzalez-Lafuente L, Sanz AB, Ruiz-Ortega M, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. Non-canonical NFκB activation promotes chemokine expression in podocytes. *Sci Rep*. 2016;6(1):28857.
 146. Maracle CX, Agca R, Helder B, et al. Noncanonical NF-κB signaling in microvessels of atherosclerotic lesions is associated with inflammation, atheromatous plaque morphology and myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2018;270:33-41.
 147. Dai X, Thiagarajan D, Fang J, et al. SM22α suppresses cytokine-induced inflammation and the transcription of NF-κB inducing kinase (Nik) by modulating SRF transcriptional activity in vascular smooth muscle cells. Ro S, ed. *PLoS One*. 2017;12(12):e0190191.
 148. Shen J, Yang M, Ju D, et al. Disruption of SM22 promotes inflammation after artery injury via nuclear factor kappaB activation. *Circ Res*. 2010;106(8):1351-1362.
 149. Li K, McGee LR, Fisher B, et al. Inhibiting NF-κB-inducing kinase (NIK): discovery, structure-based design, synthesis, structure-activity relationship, and co-crystal structures. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(5):1238-1244.
 150. Carthy EP, Yamashita W, Hsu A, Ooi BS. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and rat vascular smooth muscle cell growth. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 1989;13(6 Pt 2):954-959.
 151. Norman PE, Powell JT. Vitamin D and Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2014;114(2):379-393.
 152. Cummings LC, Thota PN, Willis JE, et al. A nonrandomized trial of vitamin D supplementation for Barrett's esophagus. Green J, ed. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184928.
 153. Hinek A, Botney MD, Mecham RP, Parks WC. Inhibition of tropoelastin expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Connect Tissue Res*. 1991;26(3):155-166.
 154. Lambert JR, Kelly JA, Shim M, et al. Prostate derived factor in human prostate cancer cells: gene induction by vitamin D via a p53-dependent mechanism and inhibition of prostate cancer cell growth. *J Cell Physiol*. 2006;208(3):566-574.

155. Tan X, Wen X, Liu Y. Paricalcitol Inhibits Renal Inflammation by Promoting Vitamin D Receptor-Mediated Sequestration of NF- κ B Signaling. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(9):1741-1752.
156. Agarwal R, Acharya M, Tian J, et al. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2005;68(6):2823-2828.
157. Guijarro C, Egido J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int*. 2001;59(2):415-424.
158. Gao D, Trayhurn P, Bing C. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the cytokine-induced secretion of MCP-1 and reduces monocyte recruitment by human preadipocytes. *Int J Obes*. 2013;37(3):357-365.
159. Wang Y-C, Hsieh C-C, Kuo H-F, et al. Effect of Vitamin D₃ on Monocyte Chemoattractant Protein 1 Production in Monocytes and Macrophages. *Acta Cardiol Sin*. 2014;30(2):144-150.
160. Molinuevo MS, Fernández JM, Cortizo AM, McCarthy AD, Schurman L, Sedlinsky C. Advanced glycation end products and strontium ranelate promote osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells in vitro: Preventive role of vitamin D. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;450:94-104.
161. Lundqvist J, Yde CW, Lykkesfeldt AE. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits cell growth and NF κ B signaling in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Steroids*. 2014;85:30-35.
162. Larriba MJ, González-Sancho JM, Bonilla F, Muñoz A. Interaction of vitamin D with membrane-based signaling pathways. *Front Physiol*. 2014;5:60.
163. Van der Heiden K, Cuhlmann S, Luong LA, Zakkar M, Evans PC. Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease. *Clin Sci (Lond)*. 2010;118(10):593-605.
164. Sun S-C. The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunol Rev*. 2012;246(1):125-140.
165. Noort AR, van Zoest KPM, Weijers EM, et al. NF- κ B-inducing kinase is a key regulator of inflammation-induced and tumour-associated angiogenesis. *J Pathol*. 2014;234(3):375-385.
166. Yamasaki K, Asai T, Shimizu M, et al. Inhibition of NFkappaB activation using cis-element “decoy” of NFkappaB binding site reduces neointimal formation in porcine balloon-injured coronary artery model. *Gene Ther*. 2003;10(4):356-364.
167. Miyake T, Aoki M, Morishita R. Inhibition of anastomotic intimal hyperplasia

- using a chimeric decoy strategy against NF κ B and E2F in a rabbit model.
168. Miyake T, Aoki M, Shiraya S, et al. Inhibitory effects of NF κ B decoy oligodeoxynucleotides on neointimal hyperplasia in a rabbit vein graft model. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41(3):431-440.
 169. Miyake T, Ihara S, Miyake T, et al. Prevention of Neointimal Formation After Angioplasty Using Nuclear Factor- κ B Decoy Oligodeoxynucleotide-Coated Balloon Catheter in Rabbit Model. *Circ Cardiovasc Interv.* 2014;7(6):787-796.
 170. Gulkarov I, Bohmann K, Cinnante KM, et al. Topical Mitogen-Activated Protein Kinases Inhibition Reduces Intimal Hyperplasia in Arterialized Vein Grafts. *J Surg Res.* 2009;154(1):150-156.
 171. Tao Z, Ghosh G. Understanding NIK regulation from its structure. *Structure.* 2012;20(10):1615-1617.
 172. Thu YM, Richmond A. NF- κ B inducing kinase: a key regulator in the immune system and in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(4):213-226.
 173. Brightbill HD, Suto E, Blaquiere N, et al. NF- κ B inducing kinase is a therapeutic target for systemic lupus erythematosus. *Nat Commun.* 2018;9(1):179.
 174. Demchenko YN, Brents LA, Li Z, Bergsagel LP, McGee LR, Kuehl MW. Novel inhibitors are cytotoxic for myeloma cells with NF κ B inducing kinase-dependent activation of NF κ B. *Oncotarget.* 2014;5(12):4554-4566.
 175. Sehnert B, Burkhardt H, Wessels JT, et al. NF- κ B inhibitor targeted to activated endothelium demonstrates a critical role of endothelial NF- κ B in immune-mediated diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(41):16556-16561.
 176. Dejardin E. The alternative NF- κ B pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(9):1161-1179.